

**Untersuchungen zur Rolle von
Sauerstoffradikalen in der Regulation von
Hypoxie-induzierbaren Faktoren**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften (FB 15)
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Eva Julia Wenner
aus Karlsruhe

Frankfurt, 2006
D30

Vom Fachbereich Biowissenschaften (FB 15) der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Rüdiger Wittig

Gutachter: Prof. Anna Starzinski-Powitz

Prof. Karl-Heinz Plate

Datum der Disputation: 24. Juli 2007

Mit dem Wissen wächst der Zweifel.

Johann Wolfgang von Goethe, 1749-1832

Die wahren Zweifel des Forschers beginnen manchmal erst mit der Gewissheit.

Niels Bohr, Physiknobelpreisträger, 1885-1962

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Sauerstoffhomöostase und Hypoxie	1
1.2	Hypoxie-induzierbare Faktoren, HIF	1
1.3	Genregulation durch HIF	3
1.4	Prolylhydroxylasen	4
1.5	Sauerstoffradikale und HIF	5
1.6	Hypoxie und Tumorgenese	7
1.7	Untersuchungen in dieser Arbeit	9
	Untersuchungen zur Rolle von Sauerstoffradikalen in der Regulation von HIF	9
	Untersuchungen zur Rolle von HIF im Tumorwachstum	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Biologische Materialien	11
2.1.1	Bakterien	11
2.1.2	Humane Zelllinien	11
2.1.3	Antikörper	12
2.1.4	Oligonukleotide	13
2.1.5	Vektoren und Plasmide	16
2.1.6	Sonden zur Northern-Blot-Hybridisierung	22
2.1.7	sonstige Nukleinsäuren	22
2.2	Sequenzierungen	22
2.3	Enzyme	23
2.4	Medien und Standardpufferlösungen	23
2.4.1	Medien	23
2.4.2	Antibiotika	24
2.4.3	Sonstige Puffer	25
2.5	Reagenzien und Chemikalien	26
2.6	Reagenziensysteme	26
2.7	Standardmethoden	27
2.7.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR)	27
2.7.2	Genotyping-PCR	28
2.7.3	RNA-Präparation	28
2.7.4	Northern-Blot-Analysen	29
2.7.5	Reverse Transkription	29
2.7.6	Quantitative <i>real time</i> PCR	30
2.7.7	Western-Blot-Analysen	32

2.7.8 Luciferase-Assay	32
2.7.9 Eisenmessung	33
2.7.10 Ferrireduktasen-Assay	34
2.7.11 sonstige Methoden	34
2.8 Zellkulturverfahren	35
2.8.1 Kultivierung von Zellen	35
2.8.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	35
2.8.3 Transfektionen	35
2.8.4 siRNA-Transfektion	37
2.8.5 Behandlung von Zellen mit Inhibitoren und anderen Reagenzien	38
2.8.6 Hypoxie-Behandlung	39
2.8.7 Zellernte zur Proteinanalyse mittels Western Blot	39
2.8.8 Immunhistochemie	40
2.9 Statistische Analyse	40
3 Ergebnisse	41
3.1 Regulation von HIF durch Sauerstoffradikale	41
3.1.1 Induktion und Stabilisierung von HIF durch ein Antioxidationsmittel	41
3.1.2 Regulation von HIF durch Erhöhung der Sauerstoffradikale	42
3.1.3 Regulation von VEGF durch ROS	45
3.1.4 Regulation von HIF durch ROS unter Normoxie	46
3.2 Zeitdauer des ROS-Effekts, Serumeffekte und Toxizität	47
3.3 Herkunft der Sauerstoffradikale	48
3.4 Abhängigkeit der HIF-Regulation durch ROS von VHL und den Prolylhydroxylasen	50
3.4.1 Abhängigkeit von VHL	50
3.4.2 Abhängigkeit von den Prolylhydroxylasen	51
3.5 Abhängigkeit der HIF-Regulation von Redox-Zustand der Zellen	53
3.5.1 Regulation von HIF durch Ascorbat	53
3.5.2 Untersuchungen zum Eisengehalt der Zelle	54
3.6 Die Ferrireduktasen als Kandidaten zur Regulation der Prolylhydroxylasen	56
3.6.1 Identifizierung der Ferrireduktasen mittels Datenbankrecherche	56
3.6.2 Klonierung der Kandidatengene	59
3.6.3 Expression der Ferrireduktasen	60
3.6.4 Einfluss der Ferrireduktasen auf HIF und HIF-Targetgene	64
3.6.5 siRNA-vermittelter <i>Knock down</i> der Ferrireduktasen	66
3.6.6 Regulation der Ferrireduktasen durch ROS	69
3.7 Etablierung eines HIF-Tet-ON-Systems in Glioblastom-Zelllinien	71

3.7.1	Etablierung und Screening stabil transfizierter Tet-ON-Zelllinien	71
3.7.2	Etablierung und Screening stabil transfizierter Tet-ON-HIF-Klone	72
3.7.3	Induzierbarkeit der Transgene HIF-2 α -dn	73
3.7.4	Induzierbarkeit von HIF-1 α und HIF-2 α	75
3.7.5	Wirkung von Doxycyclin auf die Stabilität von HIF	75
4	Diskussion	80
4.1	Der Einfluss von Sauerstoffradikalen auf die Regulation von HIF unter Normoxie und Hypoxie	80
4.2	VEGF wird sowohl durch HIF als auch durch andere Transkriptionsfaktoren reguliert	85
4.3	Einfluss der NADPH-Oxidase auf die HIF-Regulation	86
4.4	Die Regulation von HIF durch ROS ist abhängig von VHL und den PHDs	89
4.5	Der Fe ²⁺ -Gehalt in Zellen steigt nach Behandlung mit Ascorbat und ROS	91
4.6	Die Rolle der Ferrireduktasen	92
4.7	Das Tet-System in G55TL-Glioblastomzellen	97
5	Zusammenfassung	101
6	Literatur	103
7	Abkürzungsverzeichnis	117
8	Schlussbemerkung	121
9	Lebenslauf	123

1 Einleitung

1.1 Sauerstoffhomöostase und Hypoxie

Für höhere Organismen ist es lebensnotwendig, einen konstanten Sauerstoffpartialdruck in allen Geweben aufrecht zu erhalten. Sowohl das respirative als auch das kardiovaskuläre System sind daran beteiligt, das Gewebe mit dem benötigten Sauerstoff zu versorgen. Auch die Zellen selbst induzieren bei Veränderungen des O₂-Drucks verschiedene adaptive Mechanismen, um eine optimale Sauerstoffversorgung zu gewährleisten (Guillemin und Krasnow 1997). Sauerstoff dient als Elektronenakzeptor im Rahmen der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung und bei vielen anderen organischen und anorganischen Reaktionen. Die Eigenschaft, Metaboliten zu oxidieren, dient dabei oft der Umwandlung in Energie, insbesondere in ATP. Allerdings führt der Vorgang der Elektronenübertragung auch zur Bildung hoch reaktiver Zwischenprodukte, Sauerstoffradikalen oder ROS (*reactive oxygen species*). ROS wiederum können Moleküle wie Lipide, Proteine oder Nukleinsäuren in der Umgebung oxidieren. Dieser Prozess wird oxidativer Stress genannt.

Hypoxie entsteht, wenn das Sauerstoffangebot bzw. die Sauerstoffversorgung unter das Niveau sinkt, das benötigt wird, um physiologische O₂-Drücke des betreffenden Gewebes aufrecht zu erhalten, d.h. sobald der Sauerstoffbedarf das -angebot übersteigt. Der physiologische O₂-Druck, der von Geweben gewahrt werden muss, ist dabei sehr unterschiedlich und variiert zwischen 90 und 1 mmHg zwischen verschiedenen Organen, ohne dass das jeweilige Gewebe beeinträchtigt wird (Leniger-Follert, Lubbers *et al.* 1975). Sinkt der Sauerstoff-Partialdruck allerdings unter einen kritischen Wert im betroffenen Gewebe, so werden verschiedene adaptive Mechanismen aktiviert.

1.2 Hypoxie-induzierbare Faktoren, HIF

Eine Adaption an eine Verminderung des vorhandenen Sauerstoffs findet im Organismus sowohl auf organischer als auch auf genetischer Ebene statt. Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass Hypoxie-induzierte Genexpression insbesondere von zwei Transkriptionsfaktoren, HIF (*hypoxia inducible factor*) -1 α und -2 α , gesteuert wird (Review: Semenza 1999). Die Aktivierung von HIF ist ein mehrstufiger Prozess, der die Translokation des Proteins in den Zellkern, eine Heterodimerisierung, transkriptionelle Aktivierung und die

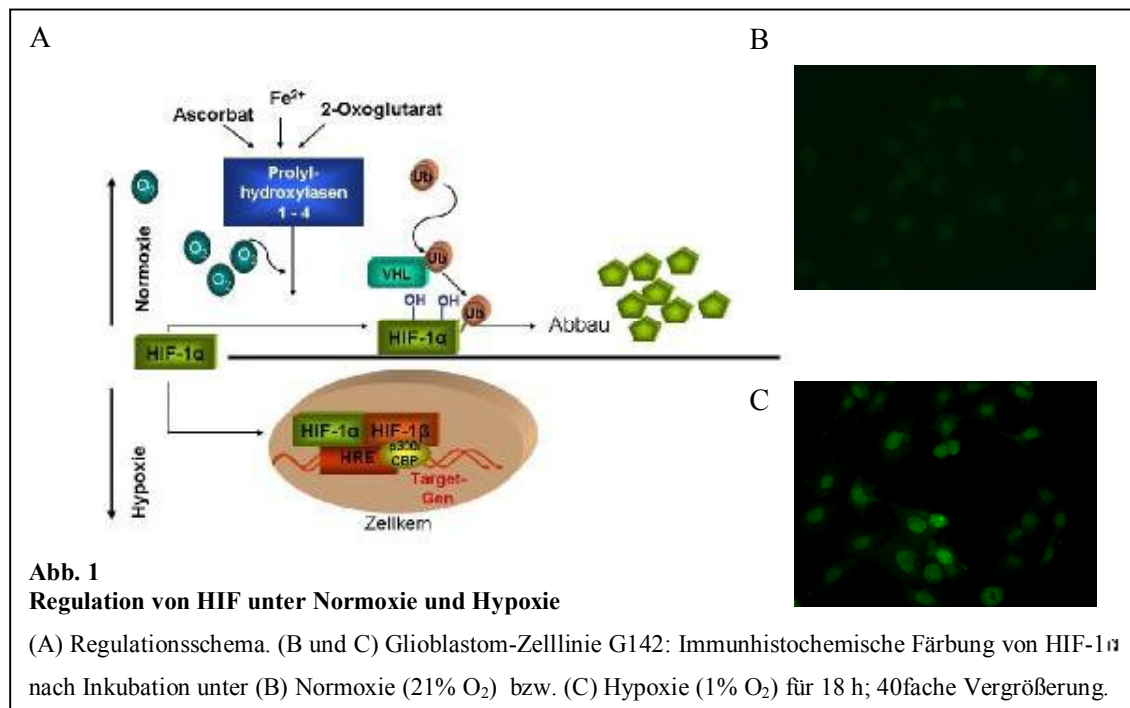
Interaktion mit anderen Proteinen beinhaltet. Einige dieser Schritte werden auch O₂-unabhängig reguliert, der sauerstoffabhängige proteosomale Abbau von HIF- α ist jedoch der zentrale Prozess (Huang, Arany *et al.* 1996; Salceda und Caro 1997).

Das HIF-Heterodimer besteht aus zwei Untereinheiten: einer α -Untereinheit, die abhängig vom O₂-Partialdruck stabilisiert wird, und einer sauerstoffunabhängigen β -Untereinheit. Es gibt dabei mehrere HIF- α -Untereinheiten, die hohe Homologien aufweisen: HIF-1 α (Wang und Semenza 1995), HIF-2 α (Tian, McKnight *et al.* 1997) sowie das verkürzte und inhibitorisch wirkende HIF-3 α (Hara, Hamada *et al.* 2001). HIF-1 α und HIF-2 α unterscheiden sich in ihren Expressionsmustern im Gewebe (Wiesener, Seyfarth *et al.* 2002) und teilweise auch in den von ihnen aktivierten Targetgenen (Wiesener, Turley *et al.* 1998; Hu, Wang *et al.* 2003; Sowter, Raval *et al.* 2003). Das HIF-1 α -Protein besteht aus 824 Aminosäuren (120 kDa), HIF-2 α aus 870 Aminosäuren (112 kDa). Die beiden Proteine weisen eine 48%ige Homologie auf. Die HIF-1 β -Untereinheit, auch ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) genannt, ist ca. 91 kDa schwer.

HIF- α und HIF-1 β haben zwei Proteindomänen gemeinsam: eine bHLH-Domäne (*basic helix-loop-helix*) und eine PAS-Domäne (benannt nach den ersten Proteinen, in denen dieses Motiv beschrieben wurde, PER, ARNT und SIM). Die basische Domäne und der C-terminale Anteil von PAS sind notwendig für die DNA-Bindung von HIF- α , während die HLH-Domäne und der N-terminale Anteil des Proteins an der Dimerbildung mit HIF-1 β beteiligt sind.

Die HIF- α -Proteine enthalten zwei Transaktivierungsdomänen (TADs), über die die Moleküle mit verschiedenen Koaktivatoren interagieren. Die Regulation der HIF- α -Proteinmenge erfolgt über eine vom O₂-Partialdruck abhängige Stabilisierung des Proteins. Das Molekül enthält eine so genannte ODD-Domäne (*oxygen dependent degradation domain*), die eine Regulation der Proteinstabilität in Abhängigkeit von der umgebenden Sauerstoffkonzentration vermittelt. Unter normoxischen Bedingungen wird das Protein durch die Prolyl-4-hydroxylasen (PHDs) enzymatisch modifiziert. Diese Enzyme hydroxylieren zwei spezifische Prolylreste in der ODD-Domäne von HIF- α (Pro⁴⁰² und Pro⁵⁶⁴ in HIF-1 α bzw. Pro⁴⁰⁵ und Pro⁵³¹ in HIF-2 α) in Abhängigkeit von 2-Oxoglutarat, Eisen und Ascorbat (Jaakkola, Mole *et al.* 2001; Ivan, Kondo *et al.* 2001). Die hydroxylierte ODD-Domäne wird von pVHL (VHL = von Hippel-Lindau), einer E3-Ubiquitin-Ligase, erkannt. pVHL vermittelt dann zusammen mit Elongin B und C die Ubiquitinierung und Degradation von HIF (Maxwell, Wiesener *et al.*

1999; Srinivas, Zhu *et al.* 1999; Cockman, Masson *et al.* 2000; Review: Kim und Kaelin 2003).



Eine dritte Hydroxylierungsstelle befindet sich in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne von HIF- α . Eine Hydroxylierung des Asparagylrests Asn⁸⁰³ (HIF-1 α) bzw. Asn⁸⁵¹ (HIF-2 α) durch das Enzym FIH (*factor inhibiting HIF*) führt zu einer sterischen Inhibition der Interaktion zwischen HIF- α und dem Koaktivator-Komplex CBP/p300 (Freedman, Sun *et al.* 2002; Lando, Peet *et al.* 2002). Des Weiteren wird HIF-1 α an einem Lysinrest innerhalb der ODD-Domäne durch die Acetyltransferase ARD1 (*arrest defective protein 1*) modifiziert. Dadurch wird die transkriptionelle Aktivierung inhibiert und ebenfalls die Degradation des Proteins induziert (Jeong, Bae *et al.* 2002). Eine neuere Studie konnte diesen Befund jedoch nicht bestätigen (Bilton, Mazure *et al.* 2005).

1.3 Genregulation durch HIF

Unter hypoxischen Bedingungen ist aufgrund einer verminderten Hydroxylierung und Ubiquitinierung der proteosomale Abbau von HIF stark reduziert, so dass die Proteinmenge ansteigt. HIF- α wird stabilisiert und akkumuliert im Zellkern. Dort bindet die α -Untereinheit an die β -Untereinheit. Dieses Heterodimer rekrutiert dann unter anderem Koaktivatoren wie p300/CBP und Ref-1 und bindet an eine spezifische Zielsequenz im Promotor, das *Hypoxia-*

responsive element oder HRE. Diese Sequenz befindet sich im Promotor oder in *Enhancer*-Regionen von Hypoxie-induzierbaren Genen und beinhaltet ein konserviertes RCGTG-Motif (Imagawa, Goldberg *et al.* 1991; Tian, McKnight *et al.* 1997). Eine Bindung von HIF an die HRE-Region führt zu einer Aktivierung der Expression des betreffenden Gens (Jiang, Rue *et al.* 1996).

Die Anpassung des Metabolismus an einen erniedrigten pO_2 findet auf zwei Wegen statt: HIF erhöht einerseits die O_2 -Versorgung über das Blutgefäßsystem durch eine Aktivierung von Genen, die unter anderem in der Angiogenese (*VEGF*, *VEGFR1/Flt-1*, *Ang-2*, *Tie-2*), Erythropoese (*EPO*) und dem Eisenstoffwechsel (Transferrin, Transferrin-Rezeptor) eine Rolle spielen (Review: Acker und Plate 2002). Andererseits findet eine metabolische Anpassung statt: HIF induziert die Expression von Glucose-Transportern (*GLUT-1* (*Glucose-Transporter-1*)) und glycolytischen Enzymen, so dass der Fluss von Glucose zu Pyruvat erhöht wird. PDK1 (*Pyruvat Dehydrogenase-Kinase*) wird ebenfalls durch HIF induziert und inhibiert unter Hypoxie die Pyruvat-Dehydrogenase, so dass die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA verhindert wird. Darüber hinaus wird Pyruvat durch LDH-A (*Lactate dehydrogenase*), ebenfalls ein HIF-Targetgen, in Lactat umgewandelt. Dadurch steht weniger Pyruvat zur Verfügung, so dass der Tricarbonsäure-Zyklus inhibiert und somit weniger Sauerstoff benötigt wird (Kim, Tchernyshyov *et al.* 2006; Papandreou, Cairns *et al.* 2006). Darüber hinaus reguliert HIF Gene, die bei Entzündungsreaktionen (*COX*; *Cyclooxygenase*), Zellproliferation (*IGF-2* und *TGF- α*) und Apoptose sowie Zellmigration (*CXCR4*; Staller, Sulitkova *et al.* 2003) eine Rolle spielen.

1.4 Prolylhydroxylasen

Die Enzymgruppe der Prolylhydroxylasen besteht aus bisher vier beschriebenen Isoformen, PHD 1-4 (Bruick und McKnight 2001; Epstein, Gleadle *et al.* 2001; Oehme, Ellinghaus *et al.* 2002), die HIF- α an spezifischen Prolylresten hydroxylieren und damit den proteosomalen Abbau unter Normoxie initiieren.

Die PHDs sind ein Eisen- und 2-Oxoglutarat-abhängiges Enzymsystem in der Familie der Dioxygenasen. Sie benötigen für ihre Funktion des Weiteren Ascorbat und molekularen Sauerstoff und gelten deshalb unter anderem als Sauerstoffsensoren in der Zelle (Review: Acker und Acker 2004). Die Prolylhydroxylasen haben einen hohen K_m -Wert für Sauerstoff

(230-250 μM), der sogar über dem atmosphärischen Sauerstoffdruck liegt, so dass ihre Aktivität über eine weite Spanne von Sauerstoffkonzentrationen reguliert werden kann (Hirsila, Koivunen *et al.* 2003). Der Kofaktor Ascorbat wirkt vermutlich als Reduktionsmittel für Eisen, das im zweiwertigen Zustand an das Enzym bindet (Knowles, Raval *et al.* 2003). Nach der Hydroxylierung der Zielproteine werden Succinat und CO_2 frei (Schofield und Zhang 1999).

Die verschiedenen Prolylhydroxylasen weisen eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation (Metzen, Berchner-Pfannschmidt *et al.* 2003) und Aktivität gegenüber HIF auf. So haben die Isoformen unterschiedlich hohe Hydroxylierungs-Aktivitäten (Huang, Zhao *et al.* 2002; Berra, Benizri *et al.* 2003; Tuckerman, Zhao *et al.* 2004), und unterschiedliche Affinitäten gegenüber HIF (Chan, Sutphin *et al.* 2005).

Die Expression der PHDs wird auf mehrfache Weise reguliert: Die PHD2- und PHD3-Expression ist Hypoxie-induziert (Berra, Richard *et al.* 2001; del Peso, Castellanos *et al.* 2003; Berra, Benizri *et al.* 2003) und somit Teil eines negativen Feedback-Mechanismus, über welchen HIF- α reguliert wird. In *Knock-down*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Expression von PHD2 und PHD3 darüber hinaus durch HIF reguliert wird (Aprelikova, Chandramouli *et al.* 2004; Marxsen, Stengel *et al.* 2004). Ein weiterer Regulationsmechanismus ist die Hypoxie-induzierte Degradation der PHDs über Siah 1 und 2, spezifische E3-Ligasen. Dieser Mechanismus ist HIF-unabhängig (Nakayama, Frew *et al.* 2004). Außerdem wird in der Literatur die Aktivierung und Regulation über verschiedene Wachstumsfaktoren, Hormone und *second messenger* beschrieben (Review: Berra, Ginouves *et al.* 2006). Eine Inhibition der Prolylhydroxylasen ist durch Übergangsmetalle, Eisenchelatoren, 2-Oxoglutarat-Analoga (Epstein, Gleadle *et al.* 2001; Jaakkola, Mole *et al.* 2001; Ivan, Kondo *et al.* 2001) und Stickstoffmonoxid (NO) (Kimura, Weisz *et al.* 2000; Sandau, Zhou *et al.* 2001; Metzen, Zhou *et al.* 2003) möglich. Dies führt zu einer Stabilisierung von HIF unter normoxischen Bedingungen.

1.5 Sauerstoffradikale und HIF

Darüber hinaus spielen Sauerstoffradikale (ROS) eine wichtige Rolle in der Regulation von HIF. ROS entstehen als Nebenprodukte in der mitochondrialen Atmungskette und bei anderen Prozessen, bei denen molekularer Sauerstoff metabolisiert wird. So sind auch die NADPH-

Oxidasen, die Xanthin-Oxidase, Glukose-Oxidase, Lipxygenase und Cyclooxygenase wichtige Produzenten von Sauerstoffradikalen in der Zelle. Durch die Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff entstehen Superoxid-Anionen ($O_2^{\bullet -}$). Diese tragen dann zur Bildung weiterer Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale ($\bullet OH$) oder Peroxynitrit ($ONOO^-$) bei. Dabei ist H_2O_2 an sich ein wenig reaktives, kleines, ungeladenes Molekül, das Membranbarrieren durchqueren und in den Zellkern diffundieren kann. H_2O_2 reagiert allerdings mit zweiwertigem Eisen in der Fenton-Reaktion zu Hydroxylradikalen und dreiwertigem Eisen ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$) (Review: Kamata und Hirata 1999).

Es gibt eine Vielzahl von Untersuchungen zur Rolle von ROS in der Regulation von HIF. Es ist dabei umstritten, ob die Bildung von ROS unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie erhöht (Chandel, Maltepe *et al.* 1998; Chandel, McClintock *et al.* 2000; BelAiba, Djordjevic *et al.* 2004; Goyal, Weissmann *et al.* 2004; Mansfield, Guzy *et al.* 2005) oder reduziert ist (Fandrey, Frede *et al.* 1994; Lee, Bender *et al.* 2001; Srinivas, Leshchinsky *et al.* 2001; Vaux, Metzen *et al.* 2001; Searle, Hartness *et al.* 2002; Liu, Berchner-Pfannschmidt *et al.* 2004; Callapina, Zhou *et al.* 2005). Diese unterschiedlichen Ergebnisse scheinen teilweise auf die Unterschiede in den untersuchten Zelltypen zurückzuführen sein: In kontraktile Zellen und Geweben, die eine hohe Mitochondrien-Dichte aufweisen, scheint die ROS-Produktion unter Hypoxie eher anzusteigen als beispielsweise in Endothelzellen (Review: White 2006).

In verschiedenen Studien wurde eine Stabilisierung von HIF unter Normoxie nach einer Verminderung von ROS im Medium (u.a. Gorlach, Berchner-Pfannschmidt *et al.* 2003; Wartenberg, Ling *et al.* 2003; Liu, Berchner-Pfannschmidt *et al.* 2004) und eine reduzierte HIF-Expression unter Hypoxie nach Erhöhung von ROS (Fandrey, Frede *et al.* 1994; Huang, Arany *et al.* 1996; Fandrey, Frede *et al.* 1997; Wiesener, Turley *et al.* 1998; Wartenberg, Ling *et al.* 2003) beschrieben. Diskutiert wird hier ein Modell, in dem die NADPH-Oxidase in direkter Abhängigkeit vom intrazellulären pO_2 als Hauptproduzent von ROS im Mittelpunkt steht. So zeigten Haddad und Land (2001) und Gorlach, Berchner-Pfannschmidt *et al.* (2003), dass eine Aktivierung der NADPH-Oxidase zu einer Destabilisierung von HIF führt. Wartenberg, Hoffmann *et al.* (2005) zeigten, dass eine Überexpression der NADPH-Oxidase NOX1 zu einer Zunahme an intrazellulären ROS und zu einem Abbau von HIF unter Hypoxie führt. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Inkubation mit NADPH-Oxidase-Inhibitoren zu einer Stabilisierung von HIF führt (Yang, Zhang *et al.* 2003; Wartenberg,

Hoffmann *et al.* 2005). Liu, Berchner-Pfannschmidt *et al.* (2004) zeigten darüber hinaus, dass die Produktion von $\cdot\text{OH}$ -Radikalen über die Fenton-Reaktion im endoplasmatischen Retikulum zum Abbau von HIF unter Normoxie beiträgt.

Konträr dazu wird diskutiert, dass unter Hypoxie der mitochondriale Komplex III als Hauptquelle von ROS an der Stabilisierung von HIF beteiligt ist (Chandel, Maltepe *et al.* 1998; Chandel, McClintock *et al.* 2000). Dem Modell des „mitochondrialen Sauerstoffsensors“ liegt zugrunde, dass durch die mitochondriale Atmungskette unter Hypoxie ROS produziert werden, die als *second messenger* auf die HIF-Stabilität wirken. Als Evidenz für dieses Modell werden Beobachtungen angeführt, nach denen eine Blockade der Zellatmung durch eine spezifische Inhibition der Mitochondrien oder Zerstörung der mitochondrialen DNA (wie in so genannten μO -Zellen) zu Defekten in der Sauerstoff-Detektion (und damit zu einer Stabilisierung von HIF) führt (Chandel, Maltepe *et al.* 1998; Chandel, McClintock *et al.* 2000; Schroedl, McClintock *et al.* 2002). Diese Beobachtung wird jedoch von anderen Gruppen widerlegt, die keine Veränderung der HIF-Stabilität nach Inhibition der Elektronentransportkette nachweisen konnten (Lee, Bender *et al.* 2001; Srinivas, Leshchinsky *et al.* 2001; Vaux, Metzen *et al.* 2001; Searle, Hartness *et al.* 2002; Enomoto, Koshikawa *et al.* 2002). Hagen, Taylor *et al.* (2003) zeigten in diesem Zusammenhang, dass eine Inhibition der mitochondrialen Atmungskette durch NO zu einer Umverteilung des intrazellulären Sauerstoffs führt und somit die Prolylhydroxylasen aktiviert und HIF abgebaut wird.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Rolle von Sauerstoffradikalen in der Regulation von HIF in der Literatur kontrovers diskutiert wird. Diese Rolle scheint auch davon abhängig zu sein, ob es sich um eine Untersuchung von normoxischen, hypoxischen oder Wachstumsfaktor-vermittelten Signalwegen handelt. Da die HIF-Stabilität unter anderem durch die Prolylhydroxylasen reguliert wird, ergibt sich die Frage, ob und wie ROS zur Aktivierung der Prolylhydroxylasen – sei es direkt oder indirekt über einen Einfluss auf Kofaktoren – führen. Diese Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit näher beleuchtet.

1.6 Hypoxie und Tumorgenese

Hypoxische Zustände im Gewebe sind typisch für eine Vielzahl von Erkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall, chronische vaskuläre Erkrankungen, Lungenerkrankungen und Tumore. So ist in der Mehrzahl untersuchter menschlicher Tumore ein erniedrigter O_2 -

Partialdruck im Vergleich zu gesundem Gewebe des entsprechenden Organs gezeigt worden (Vaupel, Kallinowski *et al.* 1989; Brown und Giaccia 1998). Tumorphypoxie entsteht durch das abnorme Wachstum von neoplastischem Gewebe, was zu einem erhöhten Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen führt. Der Grad an Hypoxie im Tumor geht einher mit einem aggressiveren und stärker metastasierenden Phänotyp (Brizel, Scully *et al.* 1996; Hockel und Vaupel 2001) sowie einer erhöhten Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie (Unruh, Ressel *et al.* 2003; Moeller, Dreher *et al.* 2005). Des Weiteren konnte man eine Korrelation zwischen der HIF-Expression in Tumoren und der Tumorprogression beobachten, d.h. mit zunehmendem Malignitätsgrad waren erhöhte HIF-Expressionsspiegel zu finden (Elson, Ryan *et al.* 2000). Histologische Befunde zeigen eine Hochregulation von HIF-1 α in verschiedenen Tumoren (Ovarialkarzinom und Oesophagealkarzinom, Darm-, Brust- und Hautkrebs) (Maxwell, Dachs *et al.* 1997; Zhong, De Marzo *et al.* 1999) sowie eine erhöhte Expression von HIF-2 α in Nierenzellkarzinomen (Krieg, Haas *et al.* 2000). Das Auftreten hypoxischer Regionen im Tumorgewebe ist ausschlaggebend für die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) und führt somit zu einer besseren Versorgung und Anpassung des Tumors an die Umgebung (Hanahan und Folkman 1996). Dieser Mechanismus wird induziert durch verschiedene Moleküle, insbesondere VEGF, den *Vascular Endothelial Growth Factor*, eines der HIF-Targetgene. Eine Vielzahl von weiteren Genen, die in Zusammenhang mit der Adaption an eine hypoxische Umgebung stehen und als HIF-Targetgene identifiziert wurden, wie z. B. Gene des Energiestoffwechsels (Glucosetransporter und glykolytische Enzyme) und der pH-Regulation (*CA IX*; *Carbonic Anhydrase IX*), wurden ebenfalls in Tumoren nachgewiesen.

Neben der Induktion von HIF durch Hypoxie wurden auch andere Mechanismen identifiziert, die die Expression und Transaktivierungsaktivität von HIF beeinflussen. Mutationen in *VHL* resultieren in einer konstitutiven Aktivierung von HIF und somit HIF-Targetgenen und sind wohl ursächlich für den beobachteten vaskulären Phänotyp VHL-assoziierter Tumore wie Hämangioblastome und klarzellige Nierenzellkarzinome (Blagosklonny 2001). Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie *p53* und *PTEN* (An, Kanekal *et al.* 1998; Zundel, Schindler *et al.* 2000) oder die Aktivierung von Onkogenen wie *V-SRC* (Jiang, Agani *et al.* 1997) und *RAS* (Chen, Pore *et al.* 2001) sowie die Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktor-Signaltransduktionswege (EGF, PDGF, Insulin, IGF) führen zu einem Anstieg der HIF-Aktivität (Zelzer, Levy *et al.* 1998, Feldser, Agani *et al.* 1999; Zhong, Chiles

et al. 2000; Richard, Berra *et al.* 2000). Auch die p42/p44 MAPK phosphoryliert HIF und aktiviert HIF-Targetgene (Berra, Milanini *et al.* 2000).

Interessanterweise führt die Aktivierung von HIF aber neben den beschriebenen Mechanismen, die zu einem erhöhten Wachstum und einer verbesserten Anpassung von Tumorzellen an die hypoxische Mikroumgebung führen, auch zur Induktion von Targetgenen, die sich negativ auf das Tumorstadium auswirken, so z.B. durch Induktion von Apoptose, die durch die Aktivierung von *p53* (Graeber, Osmanian *et al.* 1996; Carmeliet, Dor *et al.* 1998) oder proapoptotischen Mitgliedern der *bcl-2*-Familie wie *BNIX* oder *BNIP-3* (Sowter, Ratcliffe *et al.* 2001) hervorgerufen werden kann. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass HIF-1 α - bzw. HIF-2 α -Überexpression in Tumoren zu einer Wachstumsverlangsamung führen und HIF auch als Tumorsuppressor agieren kann (Blancher, Moore *et al.* 2000; Acker, Diez-Juan *et al.* 2005). Somit könnte das Resultat einer generellen HIF-Signalwegs-Inhibition von der Balance zwischen HIF-abhängigen tumorfördernden und tumorhemmenden Mechanismen innerhalb des Tumors abhängen und daher unterschiedlich ausfallen. In der Tat scheinen die bisher beschriebenen Therapieansätze diese These zu unterstützen. So wurde in verschiedenen Studien nach Blockierung von HIF eine Reduktion des Tumorstadiums beschrieben (Maxwell, Dachs *et al.* 1997; Ryan, Poloni *et al.* 2000). Im Gegensatz hierzu zeigte eine Studie, dass HIF-1 α -defiziente Tumoren aufgrund einer Reduktion der Hypoxie-vermittelten Apoptose eine erhöhte Wachstumsrate aufweisen (Carmeliet, Dor *et al.* 1998).

1.7 Untersuchungen in dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Aspekte der Hypoxie-induzierten Genexpression näher untersucht: zum einen die an der Regulation von HIF durch die PHDs beteiligten Mechanismen, zum anderen die Rolle von Hypoxie und HIF bei Tumorstadium und -angiogenese. Das Glioblastom wurde als Modellsystem gewählt, da das perinekrotische HIF-Expressionsmuster Hypoxie als wichtigen Regulator der HIF-Induktion in diesem Tumor nahe legt. Die Arbeit wurde mit verschiedenen aus Patientenmaterial etablierten Glioblastom-Zelllinien durchgeführt.

Untersuchungen zur Rolle von Sauerstoffradikalen in der Regulation von HIF

Hinsichtlich der Regulation von HIF wurde in erster Linie die Rolle von Sauerstoffradikalen untersucht. Dabei war der Einfluss von Sauerstoffradikalen auf die Prolylhydroxylasen von besonderem Interesse, da hier bisher kein direkter Zusammenhang gezeigt wurde. Um den

dieser HIF-Regulation durch ROS zu Grunde liegenden Mechanismus zu beleuchten, wurden verschiedene Methoden genutzt: Zum einen wurden genetische Modelle, d.h. Zellen oder Vektoren, in denen bestimmte an der HIF-Regulation beteiligte Faktoren wie VHL oder die PHD-Bindungsstellen defekt sind, eingesetzt. Zum anderen konnte die Regulation von HIF durch ROS auch durch die Behandlung mit PHD-Inhibitoren sowie über eine Veränderung des Redox-Zustandes der Zelle beeinflusst werden. Damit konnte eine Abhängigkeit der ROS-Regulation von den Prolylhydroxylasen gezeigt werden. Darüber hinaus wurde eine Proteinfamilie – die Ferrireduktasen – identifiziert, die diese Regulation vermitteln könnte.

Untersuchungen zur Rolle von HIF im Tumorwachstum

Die Rolle von HIF in Tumorwachstum und Progression sollte mittels eines induzierbaren Systems untersucht werden. Dabei sollten insbesondere die Einzelkomponenten, die durch das HIF-System aktiviert werden, weiter charakterisiert werden, da in Abhängigkeit von der Balance zwischen das Tumorwachstum fördernden und hemmenden Komponenten des HIF-Signalwegs mit einem verlangsamten oder beschleunigten Wachstum zu rechnen ist. Infolgedessen könnten solche Tumortypen identifiziert werden, die von einer generellen Inhibition des HIF-Signalwegs profitieren würden.

Für diese Untersuchungen wurden *HIF-1 α* , *HIF-2 α* und eine HIF-dominant-negative (*HIF-dn*) Mutante, der sowohl beide Transaktivierungsdomänen als auch die DNA-Bindungsdomäne fehlen, in einem Tetracyclin-induzierbaren System (Tet-ON-System) in die Zellen eingebracht. Anhand dieser Zellen sollte *in vitro* und *in vivo* die Rolle von Hypoxie und HIF bei Tumorwachstum und –angiogenese weiter untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Biologische Materialien

2.1.1 Bakterien

Escherichia coli **DH5α**: *E. coli*-Stamm, enthält *recA1*- und *endA1*-Mutationen (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), wurde für die meisten Transformationen im Rahmen von kleinen und großen Plasmidpräparationen verwendet.

Escherichia coli **TOP10**: *E. coli*-Stamm (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), wurde zur Transformation nach Klonierungen mit dem Directional TOPO® Expression Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) verwendet.

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte nach Sambrook (1989).

2.1.2 Humane Zelllinien

G120	humane Glioblastom-Zelllinie (von M. Westphal, Hamburg)
G123	humane Glioblastom-Zelllinie (von M. Westphal, Hamburg)
G141	humane Glioblastom-Zelllinie (von M. Westphal, Hamburg)
G142	humane Glioblastom-Zelllinie (von M. Westphal, Hamburg)
G55TL	humane Glioblastom-Zelllinie (von M. Westphal, Hamburg)
229	humane Glioblastom-Zelllinie (Diserens, de Tribolet <i>et al.</i> 1981)
U87 MG	humane Glioblastom-Zelllinie (Ponten und Macintyre 1968)
RCC10	humane Nierenzellkarzinom-Zelllinie, VHL-defizient (von C. Bauer, Zürich)
RCC10-63	humane Nierenzellkarzinom-Zelllinie, VHL rekonstituiert (Krieg, Haas <i>et al.</i> 2000)
HUVEC	Humane primäre Endothelzellen, aus der Nabelschnur isoliert (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>) (aus der Abteilung Kardiologie des Klinikums der J.W. Goethe Universität)

2.1.3 Antikörper

Primärantikörper

- HIF-1 α** monoklonaler IgG₁ aus Maus gegen humanes HIF-1 α (Transduction #610958, BD Bioscience, Erembodegem, Belgien); in der Verdünnung 1:3000 im Western Blot eingesetzt, in der Immunohistochemie 1:20 bis 1:50
- HIF-2 α** polyklonaler IgG aus Kaninchen gegen humanes HIF-2 α (Novus, Littleton, CO, U.S.A.; NB100-122) in der Verdünnung 1:500 im Western Blot eingesetzt
- V5** monoklonaler IgG_{2a} aus Maus gegen V5-Tag (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.); R960-25); in der Verdünnung 1:500 im Western Blot eingesetzt, in der Immunohistochemie 1:50 bis 1:200
- Flag** monoklonaler IgG aus Maus gegen Flag-Tag (Affinity Bioreagents; Golden, CO, U.S.A.; PA1-984A); in der Verdünnung 1:500 im Western Blot eingesetzt
- GFP** polyklonaler IgG aus Kaninchen gegen rekombinantes GFP (Abcam, Cambridge, UK; ab6556)

Sekundärantikörper

Peroxidase-konjugierte Ziege-anti-Maus IgG (Dianova); im Western Blot 1:2500 eingesetzt

Peroxidase-konjugierte Ziege-anti-Kaninchen IgG (Dianova); im Western Blot 1:2500 eingesetzt

Alexa-568 konjugierte Ziege-anti-Maus IgG (Molecular Probes, MoBiTec, Göttingen); für Immunhistochemie 1:250 eingesetzt

Alexa-488 konjugierte Ziege-anti-Maus IgG (Molecular Probes, MoBiTec, Göttingen); für Immunhistochemie 1:250 eingesetzt

2.1.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) und Sigma-Genosys (Steinheim) bezogen.

Oligonukleotide für PCR

Angegeben ist jeweils die *Annealing*temperatur T_X in der PCR (siehe 2.7.1).

	Sequenz	T_X
EGFP fw	GTACCCGGGGATCCTCTAG	58°C
HIF-2dn_TRE rev	TGGTCGGCCTCAGCTTCAGA	
hHIF-1 α fw	CCATTAGAAAGCAGTTCCGC	60°C
hHIF-1 α rev	TGGGTAGGAGATGGAGATGC	
hHIF-2 α fw	CGAACACACAAGCTCCTCTC	60°C
hHIF-2 α rev	GTCACCACGGCAATGAAAC	
VEGF fw	AGCCTTGCTTGCTGCTCTA	60°C
VEGF rev	GTGCTGGCCTTGGTGAGG	
CA9 fw	AAGAAGAGGGCTCCCTGAAG	60°C
CA9 rev	TAGCGCCAATGACTCTGGTC	
Glut-1 fw	GATTGGCTCCTTCTCTGTGG	60°C
Glut-1 rev	CAGGATCAGCATCTCAAAGG	
LDH fw	ACCCAGTTTCCACCATGATT	60°C
LDH rev	CCCAAATGCAAGGAACACT	
hHPRT fw	CCGGCTCCGTTATGGC	60°C
hHPRT rev	GGTCATAACCTGGTTCATCATCA	
β -actin fw	GAAACTACCTTCAACTCCATC	58°C
β -actin rev	CGAGGCCAGGATGGAGCCGCC	
hHIF-1 α _TRE rev	GGCCTTATCAAGATGCGAACTC	60°C
hHIF-1 α _TREhygro rev	CCGCGATGTCTTCACCTC	
CyAsc3 fw	CTTATGGTTGCTGGCATGG	60°C
CyAsc3 rev	CACAACAGTGAGGACGAAGG	
Cytb561D2 fw	ACAGGATGAGGATCGTTTCG	60°C
Cytb561D2 rev	CCAGTCATAGCCGAATAGCC	

Dcytb fw	CGTAAATACGCTTGGCCTTC	60°C
Dcytb rev	CCTTAGGACGTTTCCATTGC	
Cytb561D1 fw	TGACATGTGGACTGGTGGTC	60°C
Cytb561D1 rev	TGGAAATCTGGTGCATGATC	
Cytb561 fw	TACTTTGTGCAGTGGCTG	60°C
Cytb561 rev	CGGAAAGGAGGAAGATGG	
Cytb561 Sonde	<i>FAM</i> -CGCTACCGCCACAGCAC- <i>TAMRA</i>	
HPRT II fw	CTGGCGTCGTGATTAGTG	60°C
HPRT II rev	CTCGAGGAAGACGTTTCAG	
HPRT Sonde	<i>FAM</i> - CACCCCTTCCAAATCCTCAGCATAATG- <i>TAMRA</i>	

Oligonukleotide zur Klonierung

Angegeben ist jeweils die *Annealing*temperatur T_x und die Elongationszeit t_y in der PCR (siehe 2.7.1).

	Sequenz	T_x	t_y (min)
HIF-1α_TOPO fw	CACCATGGAGGGCGCCGGCGGC	64°C	2:30
HIF-1α_TOPO rev	GTAACTTGATCCAAAGCTCTGAG		
HIF-2α_TOPO fw	CACCATGACAGCTGACAAGGAGAAG	64°C	2:30
	A		
HIF-2α_TOPO rev	GGTGGCCTGGTCCAGGGC		
HIF-2αdn_TOPO fw	CACCATGTGCCGGCGCAGCAAG	58°C	2:30
HIF-2αdn_TOPO rev	CGACCGTCCCCTGGGTC		
Dcytb_TOPO fw	CACCATGGCCATGGAGGGCTACTGG	65°C	1:00
	C		
Dcytb_TOPO rev	CATGGTAGATCTCTGCCCAGCCT		
Cytb561D2_TOPO fw	CACCATGGCCCTTTCTGCGGAGACCG	63°C	1:00
Cytb561D2_TOPO rev	TGGTTGGATCCTCTTGCGGTATAG		
Cytb561_TOPO fw	CACCATGGAGGGCGGGGCCGCGG	63°C	1:00
Cytb561_TOPO rev	CTGGGAGCCGGGGCTATCTCC		
Cytb561D1_TOPO fw	CACCATGCAGCCCCTGGAGGTAGGTC	63°C	2:30
	TGGTTCCC		

Cytb561D1_TOPO rev	TCACTGCGGGTCCTGCTGGAGATGAT		
CyAsc3_TOPO fw	CACCATGGTGTCTGGACGGTTCTACT	67°C	1:00
	TG		
CyAsc3_TOPO rev	TCTGTTCGGTCAGGATCCCCGG		

Oligonukleotide für die in-vitro-Mutagenese

Angegeben ist jeweils die *Annealing*temperatur T_X und die Elongationszeit t_Y in der PCR (siehe 2.7.1).

	Sequenz	T_X	t_Y (min)
HIF-1α	GACCAGTTATGATTGTGAAGTTgcAGCTC	55°C	6:00
sense_N803A-1	CTATACAAGGCAGCAG		
HIF-1α	CTGCTGCCTTGATTAGGAGCTgcAACTTC		
antisense_N803A-1	ACAATCATTACTGGTC		
HIF-2α	ATGACTGTGAGGTggCCGTGCCCCGTGCT	55°C	9:00
sense_N847A-2			
HIF-2α	CAGCACGGGCACggCCACCTCACAGTCA		
antisense_N847A-2	T		

Oligonukleotide zur Herstellung von siRNAs

	Sequenz
hHIF-1α antisense siRNA	AAAGATAAGTTCTGAACGTCGCCTGTCTC
hHIF-1α sense siRNA	AACGACGTTTCAGAACTTATCTCCTGTCTC
sima antisense siRNA	AAGGAGACAGAGATATTCATGCCTGTCTC
sima sense siRNA	AACATGAATATCTCTGTCTCCCCCTGTCTC
Cytb561 antisense siRNA	AAGTATAGCGCATTTGAGCCCCCTGTCTC
Cytb561 sense siRNA	AAGGGCTCAAATGCGCTATACCCTGTCTC
Cyb561D2 antisense siRNA	AAGCTATACCATGCTACTTCTCCTGTCTC
Cyb561D2 sense siRNA	AAAGAAGTAGCATGGTATAGCCCTGTCTC
Cyb561D1 antisense siRNA	AAGCCATCCTACTCTTCTCACCCCTGTCTC
Cyb561D1 sense siRNA	AAGTGAGAAGAGTAGGATGGCCCTGTCTC

CybAsc3 antisense siRNA	AATGAGAAGCTTTTCTTCAGTCCTGTCTC
CybAsc3 sense siRNA	AAACTGAAGAAAAGCTTCTCACCTGTCTC
Cytb red1 antisense siRNA	AAATTCTACCATTCTTCATCCCCTGTCTC
Cytb red1 sense siRNA	AAGGATGAAGAATGGTAGAATCCTGTCTC

2.1.5 Vektoren und Plasmide

Kommerziell erhältliche Plasmide

pcDNA3	eukaryoter Expressionsvektor; das eingefügte Gen steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors; enthält eine Ampicillin-Resistenz (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)
pcDNA3.1 D/V5-His-TOPO[©]	eukaryoter Expressionsvektor; das eingefügte Gen steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors; enthält außerdem ein V5-Epitop sowie ein Polyhistidin-Tag; enthält eine Ampicillin-Resistenz (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)
pTet-ON	Regulationsvektor im Tet-ON TM -System; exprimiert rtTA (<i>reverse Tet-controlled transactivator</i>); enthält eine Ampicillin-Resistenz (Clontech, BD Bioscience, Erembodegem, Belgien)
pTet-tTS	enthält einen Tetracyclin-kontrollierten transkriptionellen <i>Silencer</i> (tTS), der in Abwesenheit von Doxycyclin an TRE bindet und dadurch die Expression verhindert, sowie eine Resistenz gegen das Antibiotikum G418 zur Selektion in eukaryoten Zellen und eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion in Bakterien (Clontech, BD Bioscience, Erembodegem, Belgien)

pTRE2	<i>Response</i> -Vektor im Tet-ON™-System; enthält ein <i>Tet response element</i> (TRE), das aus sieben Kopien einer Sequenz besteht, die für die <i>tet Operator sequence</i> (tetO) codiert, und dazu führt, dass der nachfolgende Minimalpromotor ϕ CMV*-1 in Abwesenheit von rTetR inaktiv ist. Die Expression von Genen, die hinter dem Promotor inseriert sind, wird so durch das rtTA-Regulationsprotein gesteuert. Das Plasmid enthält eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion in Bakterien (Clontech, BD Bioscience, Erembodegem, Belgien)
pTRE2hygro	wie pTRE2, mit zusätzlicher Hygromycin-Resistenz zur Selektion (Clontech, BD Bioscience, Erembodegem, Belgien)
pECFP-C1	kodiert für ein <i>enhanced cyan fluorescent variant</i> des <i>Aequorea victoria green fluorescent protein</i> (GFP); enthält eine Resistenz gegen Chloramphenicol zur Selektion in Bakterien (Clontech, BD Bioscience, Erembodegem, Belgien)
pTK-Hyg	Selektionsplasmid zur Ko-Transfektion mit pTRE2, das für eine Hygromycin-Resistenz kodiert (Clontech, BD Bioscience, Erembodegem, Belgien)
IRATp970D0485D	IMAGE-Klon: Humane cDNA-Sequenz der Cytochrom b reductase 1 (<i>Cytb1</i>) in pCMV-SPORT6 (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD), Berlin)
HU3_p983F05138D	IMAGE-Klon: Humane cDNA-Sequenz von Cytochrom b 561 (<i>Cytb561</i>) in pT7T3D-PacI (RZPD, Berlin)
HU3_p983E0391D	IMAGE-Klon: Humane cDNA-Sequenz von Cytochrom b 561 domain containing 1 (<i>Cytb561D1</i>) in pT7T3D-PacI (RZPD, Berlin)

IRATp970B0475D IMAGE-Klon: Humane cDNA-Sequenz von Cytochrom b 561 domain containing 2 (*Cytb561D2*) in pCMV-SPORT6 (RZPD, Berlin)

IRATp970D1075D IMAGE-Klon: Humane cDNA-Sequenz von Cytochrom b, ascorbate dependent 3 (*CyAsc3*) in pCMV-SPORT6 (RZPD, Berlin)

im Labor vorhandene Plasmide

mHIF-2 α -dn-Flag in pcDNA3 verkürztes murines HIF-2 α , das einen transdominant negativen Effekt hat (Elvert, Kappel *et al.* 2003)

hHIF-2 α in pcDNA3 Vollständige cDNA-Sequenz des humanen HIF-2 α in pcDNA (von S. McKnight)

hHIF-1 α in pcDNA Vollständige cDNA-Sequenz des humanen HIF-1 α in pcDNA (von R. Wenger)

hHIF-1 α in pBSK Vollständige cDNA-Sequenz des humanen HIF-1 α in pBluescript (von R. Wenger)

pcDNA3-HA-HIF-1 α APP humanes HIF-1 α mit mutierten Prolylbindungsstellen mit HA-Tag in pcDNA3 (von W. Kaelin)

pcDNA3-HA-HIF-2 α APP humanes HIF-2 α mit mutierten Prolylbindungsstellen mit HA-Tag in pcDNA3 (von W. Kaelin)

pUHC 13-3 Luciferase-Reporter-Konstrukt unter der Kontrolle eines *tetO*-CMV-minimal Promotors (Gossen und Bujard 1992)

pVEGF.13-Luci Luciferase-Reporter-Konstrukt unter der Kontrolle des VEGF-Promotors

pHRE-Luci	Luciferase-Reporter-Konstrukt, unter der Kontrolle eines dreifachen HRE-Promotors aus <i>EPO</i> , bei dem die Sp1-Bindungsstelle deletiert ist (siehe Tian, McKnight <i>et al.</i> 1997) (von J. Pouyssegur)
pRL-SV40	Renilla-Luciferase-Reporterkonstrukt unter der Kontrolle des SV40-Promotors
pVEGF	humanes VEGF im pSPT18-Expressionsvektor (von C. Dehio)

Im Verlauf der Arbeit hergestellte Plasmide

hHIF-1α in pTRE2	Das HIF-1 α -Fragment wurde mit <i>VspI/ClaI</i> -Schnittstellen aus pBSK isoliert und über die <i>EcoRV/ClaI</i> -Schnittstellen hinter den pHCMV^*-1 Promoter in pTRE2 kloniert
hHIF-2α in pTRE2	Das HIF-2 α -Fragment wurde mit <i>KpnI/XbaI</i> -Schnittstellen aus pcDNA isoliert und über die <i>MluI/NheI</i> -Schnittstellen hinter den pHCMV^*-1 Promoter in pTRE2 kloniert
hHIF-1α in pTRE2hygro	Das HIF-1 α -Fragment wurde mit <i>VspI/ClaI</i> -Schnittstellen aus pBSK isoliert und über die <i>EcoRV/ClaI</i> -Schnittstellen hinter den pHCMV^*-1 Promoter in pTRE2hygro kloniert
hHIF-2α in pTRE2hygro	Das HIF-2 α -Fragment wurde mit <i>KpnI/XbaI</i> -Schnittstellen aus pcDNA isoliert und über die <i>MluI/NheI</i> -Schnittstellen hinter den pHCMV^*-1 Promoter in pTRE2hygro kloniert
HIF-2α-dn in pTRE2hygro	Das HIF-2 α -dn-Fragment wurde über die <i>BamHI/NotI</i> -Schnittstellen aus pcDNA3 isoliert und in pTRE2hygro kloniert

GFP in pTRE2hygro	Das GFP-Fragment wurde über die <i>VspI/SaI</i> -Schnittstellen aus pECFP-C1 isoliert und über die <i>PvuII/SaI</i> -Schnittstellen in pTRE2hygro kloniert
GFP in pTRE2	Das GFP-Fragment wurde über die <i>VspI/SaI</i> -Schnittstellen aus pECFP-C1 isoliert und über die <i>PvuII/SaI</i> -Schnittstellen in pTRE2 kloniert
hHIF-1α-V5 in pcDNA3.1	hHIF-1 α wurde unter Verwendung der HIF-1 α _TOPO fw- und HIF-1 α _TOPO rev-Primer vollständig aus pTRE2hygro-HIF-1 α amplifiziert und anschließend in pcDNA3.1-V5-TOPO© hinter den CMV-Promotor und vor die Sequenz des V5-Tags im Leserahmen kloniert
hHIF-1α-APP-V5 in pcDNA3.1	hHIF-1 α -APP wurde unter Verwendung der HIF-1 α _TOPO fw- und HIF-1 α _TOPO rev-Primer vollständig aus pcDNA3-HA-Hif1dPP amplifiziert und anschließend in pcDNA3.1-V5-TOPO© hinter den CMV-Promotor und vor die Sequenz des V5-Tags im Leserahmen kloniert
hHIF-2α-V5 in pcDNA3.1	hHIF-2 α wurde unter Verwendung der HIF-2 α _TOPO fw- und HIF-2 α _TOPO rev-Primer vollständig aus pTRE2hygro-HIF-2 α amplifiziert und anschließend in pcDNA3.1-V5-TOPO© hinter den CMV-Promotor und vor die Sequenz des V5-Tags im Leserahmen kloniert
hHIF-2α-APP-V5 in pcDNA3.1	hHIF-2 α -APP wurde unter Verwendung der HIF-2 α _TOPO fw- und HIF-2 α _TOPO rev-Primer vollständig aus pcDNA3-HA-Hif2dPP amplifiziert und anschließend in pcDNA3.1-V5-TOPO© hinter den CMV-Promotor und vor die Sequenz des V5-Tags im Leserahmen kloniert

pcDNA-HIF dn-V5	HIF-2 α -dn wurde unter Verwendung der HIF-2 α dn_TOPO fw- und HIF-2 α dn_TOPO rev-Primer vollständig aus pTRE2hygro-HIF-2 α dn amplifiziert und anschließend in pcDNA3.1-V5-TOPO© hinter den CMV-Promotor und vor die Sequenz des V5-Tags im Leserahmen kloniert
hHIF-1α-APPA-V5 in pcDNA3.1	In hHIF-1 α -APP-V5 wurde mittels der Primer HIF-1 α sense_N803A-1 und HIF-1 α antisense_N803A-1 und dem QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit an der Bindungsstelle von FIH der Asparaginrest 803 zu Alanin mutiert.
hHIF-2α-APPA-V5 in pcDNA3.1	In hHIF-2 α -APP-V5 wurde mittels der Primer HIF-2 α sense_N847A-2 und HIF-2 α antisense_N847A-2 und dem QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit an der Bindungsstelle von FIH der Asparaginrest 847 zu Alanin mutiert.
Cytb561-V5 in pcDNA3.1	Die vollständige cDNA-Sequenz von Cytb561 aus HU3_p983F05138D mittels der entsprechenden TOPO-Primer amplifiziert und anschließend in pcDNA3.1-V5-TOPO© hinter den CMV-Promotor und vor die Sequenz des V5-Tags im Leserahmen kloniert
Cytb561D1-V5 in pcDNA3.1	Die vollständige cDNA-Sequenz von Cytb561D1 aus cDNA von RCC10-Zellen mittels der entsprechenden TOPO-Primer amplifiziert und anschließend in pcDNA3.1-V5-TOPO© kloniert (s.o.)
Cytb561D2-V5 in pcDNA3.1	Die vollständige cDNA-Sequenz von cytb561D2 aus IRATp970B0475D mittels der entsprechenden TOPO-Primer amplifiziert und anschließend in pcDNA3.1-V5-TOPO© kloniert (s.o.)

CyAsc3-V5 in pcDNA3.1	Die vollständige cDNA-Sequenz von CyAsc3 aus IRATp970D1075D mittels der entsprechenden TOPO-Primer amplifiziert und anschließend in pcDNA3.1-V5-TOPO© kloniert (s.o.)
Dcytb-V5 in pcDNA3.1	Die vollständige cDNA-Sequenz von Dcytb aus IRATp970D0485D mittels der entsprechenden TOPO-Primer amplifiziert und anschließend in pcDNA3.1-V5-TOPO© kloniert (s.o.)

2.1.6 Sonden zur Northern-Blot-Hybridisierung

HIF-1α	Das für die Sonde verwendete Fragment wurde mit <i>KpnI/NotI</i> -Schnittstellen aus hHIF-1 α in pBSK geschnitten.
HIF-dn	Das für die Sonde verwendete Fragment wurde mit <i>BamHI/NotI</i> -Schnittstellen aus mHIF-2 α dn-Flag geschnitten.
VEGF	Das für die Sonde verwendete Fragment wurde mit <i>BAmHI/EcoRI</i> -Schnittstellen aus pVEGF geschnitten.

2.1.7 sonstige Nukleinsäuren

Die DNA-Größenstandards (1kb-Leiter; 100bp-Leiter) wurde von MBI Fermentas (St.Leon-Rot) bezogen.

dNTPs wurden über Promega (Promega, Madison, WI, U.S.A.) bezogen, *random hexamers* für die Initialisierung der reversen Transkription wurden über Roche (Mannheim) bezogen.

2.2 Sequenzierungen

Alle umklonierten oder selbst aus cDNA klonierten Plasmide wurden von der Firma GATC Biotech (Konstanz) sequenziert. Die Sequenzen wurden dann mit Hilfe der

CloneManager™-Software mit den unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> hinterlegten abgeglichen. Für die Sequenzierungen wurden folgende Primer verwendet:

pTRE MCS	GCAGAGCTCGTTTAGTGAACC
pcDNA3.1 MCS	TTGACGCAAATGGGCGGTAG
pcDNA3.1-RP/1	CAAACAACAGATGGCTGGC
HIF-1a int1	ACCTGCTTGGTGCTGATTTG
HIF-1a int2	CCATTACCCACCGCTGAAAC
HIF-1a int3	TTCCGATGGAAGCACTAGAC
HIF-1a int4	CTAGCCGAGGAAGAACTATG
HIF-2a int1	CTGCCCTCCTCACAATAGTC
HIF-2a int2	CGCCCAATAGCCCTGAAGAC
HIF-2a int3	CCTATGGCAAGGCCATCCTG

2.3 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von MBI Fermentas (St.Leon-Rot) bezogen. Die Enzyme für die reverse Transkription, RNA Guard®, SuperScript II® sowie RNase H wurden von Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A. bezogen.

Taq Polymerase wurde ebenfalls von Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A. bezogen.

Die Amplifikation von cDNA für die Klonierung wurde mit PfuUltra™ High-Fidelity DNA Polymerase (Stratagene, Cedar Creek, TX, U.S.A.) durchgeführt.

Für die quantitative *real time* PCR wurde der ABSolute™ QPCR SYBR® Green Mix bzw. bei Verwendung von Sonden der ABSolute™ QPCR Mix (ABgene, Epsom, UK) verwendet.

2.4 Medien und Standardpufferlösungen

2.4.1 Medien

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)	20 g LB (idg, Bury, UK) wurden in 1 l H ₂ O gelöst und autoklaviert.
---	---

LB-Agar	32 g wurden in 1 l H ₂ O gelöst und autoklaviert (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), nach Abkühlen auf 60°C mit entsprechenden Antibiotika-Konzentrationen auf 10cm-Platten gegossen.
DMEM (Dulbecco's MEM mit Glutamax)	wurde über GibcoBRL (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) bezogen
FCS (Fötales Kälberserum)	wurde über PAN Systems (Aidenbach) bezogen und vor Verwendung für 45 min bei 60°C inaktiviert
Zellkulturmedium	DMEM mit 10% FCS
Selektionsmedium	DMEM mit 10% FCS und entsprechender Antibiotika-Konzentration
OptiMEM® I	wurde für siRNA-Transfektionen verwendet und über GibcoBRL (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) bezogen
PBS (Phosphate buffered saline)	wurde über Seromed Biochrom KG, Berlin, bezogen
Trypsin/EDTA	wurde über GibcoBRL (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) bezogen

2.4.2 Antibiotika

Zur Selektion verwendete Antibiotika wurden über Sigma, Taufkirchen, bezogen und in folgenden Endkonzentrationen zu den Medien gegeben:

Ampicillin	100 µg / ml
Chloramphenicol	170 µg / ml
Hygromycin	200 µg / ml
G418 (Geneticin)	1 mg /ml

2.4.3 Sonstige Puffer

10* MOPS	0,4 M Morpholinopropanesulfonic acid; 0,1 M Sodium Acetat 3H ₂ O; 10 mM EDTA-Na ₂ -2H ₂ O; pH mit NaOH auf 7,2 eingestellt
20* SSC	3 M NaCl; 0,3 M Trisodium-Citrat
Na-Acetat	3 M Na-Acetat; pH 5,2 mit Essigsäure eingestellt

Zur Proteinanalyse mittels Western Blot:

Trenngel (8%)	1,875 ml Stock (100 mM TrisBase pH 8,8, eingestellt mit 5 M HCl; 2,5 mM SDS); 2 ml 30% Arylamide; 3,55 ml H ₂ O; 75µl 10% APS; 3µl TEMED
Trenngel (12%)	1,875 ml Stock (100 mM TrisBase pH 8,8, eingestellt mit 5 M HCl; 2,5 mM SDS); 3 ml 30% Arylamide; 2,55 ml H ₂ O; 75µl 10% APS; 3µl TEMED
Ladegel (4%)	1,25 ml Stock (30mM TrisBase pH 6,8, eingestellt mit 5M HCl; 2,5mM SDS); 0,85 ml 30% Arylamide, 2,75 ml H ₂ O; 62µl 10% APS; 6,25 µl TEMED
Laufpuffer	25 mM TrisBase; 96 mM Glycin; 0,1% SDS (20%)
Transfer-Puffer	25 mM TrisBase; 192 mM Glycin (75,07); 20% Methanol

2.5 Reagenzien und Chemikalien

Die eingesetzten Chemikalien und Medienkomponenten wurden, wenn nicht anders beschrieben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen), Fluka (Buchs, Schweiz) und Merck (Darmstadt) bezogen.

2.6 Reagenziensysteme

- Für Western Blots wurden folgende Reagenzien der Firma Amersham Bioscience, Freiburg verwendet:
 - Proteingrößenstandard (*Full range rainbow marker*)
 - Hybond ECL™ - Membranen zum Blotten
 - Zur Entwicklung: ECL Western Blotting Detection System™ und ECL plus™ System
- Große Plasmidpräparation mit dem Plasmid Maxi Kit® bzw. EndoFree Plasmid Maxi Kit® (Qiagen, Hilden).
- die Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten nach Restriktionsspaltungen erfolgte mittels PCR Purification Kit® oder Gel Extraction Kit® (Qiagen, Hilden).
- Phenol-Chloroform-Extraktionen von DNA wurden mit Hilfe des Phase-Lock-Gel-Systems™ (Eppendorf, Wesseling) durchgeführt.
- Die Präparation von RNA erfolgte mit dem Rneasy® Mini Kit mit DNase Verdau (Qiagen, Hilden).
- die Herstellung radioaktiver RNA-Sonden für Northern Blot Analysen wurde mit Hilfe von Prime-It® II Random Primer Labeling Kit (Stratagene, Cedar Creek, TX, U.S.A.) durchgeführt. Die Abtrennung radioaktiver Nukleotide erfolgte über Sephadex G50 Fine Quick Spin™ Säulen (Roche, Mannheim). Die Hybridisierung wurde in QuikHyb® Hybridization Solution (Stratagene, Cedar Creek, TX, U.S.A.) durchgeführt.
- Die Klonierung von cDNA in den pcDNA3.1-Vektor erfolgte mit Hilfe des pcDNA3.1 Directional TOPO® Expression Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)

- Die *in-vitro*-Mutagenese von HIF- α -PP zu HIF- α -PPA wurde mit dem QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Cedar Creek, TX, U.S.A.) durchgeführt.
- Die Herstellung von siRNAs erfolgte mit dem *Silencer*TM siRNA Construction Kit (Ambion, Austin, TX, U.S.A.), die Transfektion der siRNAs mit OligofectamineTM (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.).
- die transiente und stabile Transfektion von G55TL-Zellen erfolgte mit SuperfectTM Transfection Reagent (Qiagen, Hilden).
- Die Proteinbestimmung für Western Blots erfolgte mit D_C-Protein Reagents Package von Bio-Rad (München) nach der Methode von Lowry (Lowry, Rosebrough *et al.* 1951).
- Die *in-vitro*-Transkription und -Translation wurde mit dem TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System von Promega, Madison, WI, U.S.A., durchgeführt.
- Für Luciferase-Assays wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford mit Bio-Rad Protein Assay Reagenz (Bio-Rad, München) durchgeführt. Für den Luciferase-Assay selbst wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System von Promega, Madison, WI, U.S.A., verwendet.

2.7 Standardmethoden

2.7.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient der Amplifizierung von Gensequenzen zwischen zwei Primern (Mullis, Faloona *et al.* 1986).

Ein Reaktionsansatz enthielt:	1 x PCR-Puffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)
	200 μ M dNTPs
	200 pm 5'-Primer
	200 pm 3'-Primer
	1 mM MgCl ₂
	0,2 μ l Tag-Polymerase
	H ₂ O ad 20 μ l

Die Reaktionsbedingungen lauteten wie folgt:

3 min	94 °C	(Denaturierung)	
1 min	94 °C	} 25-35 Zyklen	
1 min	X °C		
Y min	72 °C		
10 min	72 °C	(Elongation)	
4 °C	∞		

Die Elongationszeit t_Y war abhängig von der Größe des Amplifikates; pro 1000 Nukleotide wurde 1 min Elongationszeit gerechnet (abweichende Zeiten sind unter 2.4.1 angegeben).

Die *Annealing*temperatur T_X war abhängig von der jeweiligen Schmelztemperatur T_m der verwendeten Primer und ist ebenfalls unter 2.1.4 angegeben.

Die Anzahl der verwendeten Zyklen war abhängig von der Expressionsstärke des untersuchten Gens.

2.7.2 Genotyping-PCR

Um Zellen nach einer stabilen Transfektion schnell auf die Anwesenheit des Transgens untersuchen zu können, wurde eine so genannte Genotyping-PCR etabliert.

Dazu werden 50.000 Zellen gewaschen, durch Trypsin-Behandlung von der Schale gelöst, bei 9300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 50 µl PCR-Lysis-Puffer (50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 10mM Tris, pH 8,3; 0,45% NP-40; 0,45% Tween-20; 100 µg/ml Proteinase K) resuspendiert, kurz gemischt und dann im Heizblock unter Schütteln bei 37°C für 20 min lysiert. Von diesem Lysat wird 1 µl als Template in der PCR eingesetzt. Für die PCR wurde für Tet-Konstrukte immer der Primer EGFP fw als „forward“-Primer verwendet, da dieser an eine Sequenz im Bereich der *multiple cloning site* von pTRE und pTREhygro bindet, als „reverse“-Primer jeweils ein genspezifischer (siehe 2.1.4).

2.7.3 RNA-Präparation

Zur Isolierung von RNA aus Zellen wurden je nach Versuchsdauer zwischen 40.000 und 60.000 Zellen auf zwei 6-*Wells* verteilt ausgebracht. Nach entsprechender Behandlung (Transfektion, Hypoxiebehandlung) wurden die Zellen vor der Ernte zweimal mit kaltem PBS gewaschen und dann in RLT-Puffer aus dem RNeasy® Mini Kit abgeschabt (Qiagen,

Hilden). Die weitere RNA-Präparation erfolgte nach Herstellerangaben und beinhaltete einen DNase-Verdau auf den Säulchen. Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde photometrisch bestimmt und die RNA dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.7.4 Northern-Blot-Analysen

Zur Untersuchung der Expression verschiedener Gene wurden Northern-Blot-Analysen durchgeführt. Diese qualitative und quantitative Analyse erfolgte in denaturierenden Formaldehydgelen. Die Durchführung der Northern Blots (Gele, Blotten, Hybridisierung) erfolgte nach Sambrook 1989). Die Elektrophorese wurde bei 40 V in MOPS-Puffer durchgeführt. Durch Kapillartransfer wurde dann die aufgetrennte RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Duralon-UV™; Stratagene, Cedar Creek, TX, U.S.A.) transferiert. Zur Sondenmarkierung mit radioaktivem $\alpha^{32}\text{P}$ wurde der Prime-It® II Random Primer Labeling Kit (Stratagene, Cedar Creek, TX, U.S.A.) verwendet. Nach Denaturierung des zu markierenden DNA-Doppelstranges erfolgte der Nukleotideinbau des [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP durch die Klenow-Polymerase, wobei Random-Hexamere als Primer dienten. Die Abtrennung nicht eingebauter radioaktiver Nukleotide erfolgte über Sephadex G50 Fine Quick Spin™ Säulen (Roche, Mannheim). Die Hybridisierung wurde in QuikHyb® Hybridization Solution (Stratagene, Cedar Creek, TX, U.S.A.) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die angefeuchtete Membran wurde zunächst mit dem Hybridisierungspuffer für 20 min bei 68 °C vorhybridisiert. Anschließend wurde die zuvor radioaktiv markierte und denaturierte Sonde für 1 h bei 68 °C hybridisiert. Danach wurden die Blots drei Mal bei 60°C mit Waschpuffer (2*SSC; 0,1% SDS) gewaschen, um unspezifisch gebundene Radioaktivität zu entfernen. Im Anschluss wurde die Membran feucht in Folie eingeschweißt und bei -80 °C autoradiographiert. Zur erneuten Verwendung der Blots wurde die gebundene Radioaktivität durch zehnminütige Inkubation in kochendem 0,1 % SDS entfernt.

2.7.5 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde jeweils 1 µg RNA eingesetzt. Die reverse Transkription wurde mit Superscript II RT™ nach Herstellerangaben (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) durchgeführt.

2.7.6 Quantitative *real time* PCR

Die quantitative *real time* PCR ermöglicht eine exakte Quantifizierung von PCR-Produkten über die Detektion von Fluoreszenzsignalen, die mit der PCR-Produktbildung einhergehen. Dabei wird zur Reaktion entweder ein an den Doppelstrang bindender Fluoreszenz-Farbstoff (*SYBR green*) zugegeben oder eine ebenfalls Fluoreszenz-markierte Hybridisierungs-sonde, die an das PCR-Produkt binden kann (Review: Bustin, Benes *et al.* 2005).

Die PCR-Reaktion wurde mit dem ABSolute™ QPCR SYBR Green Mix (ABgene, Epsom, UK), je 80 nM der entsprechenden *forward*- und *reverse*-Primer und 0,1 µl cDNA aus der unter 2.7.5 beschriebenen reversen Transkriptionsreaktion durchgeführt. Die PCR und Detektion wurde mit Hilfe des iCycler™ iQ-Systems (Bio-Rad, München) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen lauteten dabei wie folgt:

15 min	95 °C	(Aktivierung der DNA Polymerase)
30 sec	95 °C	} 40 Zyklen
30 sec	60 °C	
45 sec	72 °C	
1 min	95 °C	
1 min	60 °C	
10 sec	55 °C	Anstieg der Temperatur in 0,5 °C-Schritten bis 95 °C
4 °C	4 °C	

Die Quantifizierung erfolgt dabei über eine Software-gestützte Berechnung eines Fluoreszenzschwellenwertes. Der Zyklus, in dem eine zu untersuchende Probe diesen Schwellenwert (der das zehnfache der Fluoreszenz während der ersten PCR-Zyklen beträgt, das „Rauschen“) überschreitet, wird als Schwellenwertzyklus (*Threshold Cycle*, C_t) der jeweiligen Probe zugewiesen (Neusser 2001). Über diesen C_t -Wert des zu untersuchenden Gens (*Gene of interest*, GOI) und dem C_t -Wert eines im gleichen Durchlauf parallel amplifizierten Haushaltsgens (*housekeeping gene*, HKG) kann nun die relative Expression errechnet werden. Dies geschieht mit Hilfe der Formel

$$\text{Relative Expression} = \frac{(E_{GOI})^{\Delta C_t GOI}}{(E_{HKG})^{\Delta C_t HKG}}$$

Der ΔC_t -Wert ist dabei die Differenz aus dem C_t -Wert der unbehandelten Kontrolle und der zu untersuchenden Probe (Pfaffl 2001). Die Effizienz E der PCR-Reaktion mit dem jeweiligen Primerpaar wird bestimmt über die Quantifizierung einer DNA-Verdünnungsreihe über fünf bis sechs log-Stufen. Daraus lässt sich mit Hilfe der iCycler™-Software eine Standardkurve berechnen, aus der sich die Effizienz der Reaktion ableiten lässt. Da man bei einer PCR-Effizienz von 100% genau eine Verdopplung der Produktmenge pro Zyklus erwarten würde, wäre die Differenz zwischen den C_t -Werten einer zehnfachen Verdünnung dann genau 3,2 (da $2^{3,2}=10$). In den meisten Fällen entstehen jedoch auch Nebenprodukte wie Primerdimere oder unspezifische Sekundärprodukte, so dass die Effizienz selten bei 100% liegt. Die hier verwendeten Primer wurden so weit optimiert, dass sie über eine Spanne von fünf log-Stufen in der Verdünnungsreihe eine PCR-Effizienz von mindestens 85% erreichten.

Im Einzelnen hatten die Reaktionen die folgenden Effizienzen:

Primer (siehe 2.4.1)	Effizienz E
HIF-1 α	89,3%
HIF-2 α	96,1%
VEGF	97,0%
CA IX	80,3%
GLUT-1	97,1%
LDH	85,9%
CyAsc3	91,0%
Cytb561D2	99,6%
Cytb561 (Sonde)	98,8%
Dcytb	90,0%
Cyb561D1	97,1%
pTRE-hHIF-1 α	87,6%
pTRE-hHIF-2 α	91,0%
pTRE-HIF-2 α dn	86,9%
pTREhygro-hHIF-1 α	85,5%
pTREhygro-hHIF-2 α	89,0%
HPRT	95,7%
β -actin	88,0%
HPRT (Sonde)	98,0%

Eine weitere ständige Kontrolle jeder PCR-Reaktion erfolgte über die Analyse der Schmelzkurven, bei welcher ebenfalls die Bildung von Primerdimeren und anderen unspezifischen Nebenprodukten erkennbar ist.

2.7.7 Western-Blot-Analyse

Zur Analyse der Proteinexpression mittels Western Blots wurden die zu untersuchenden Zellen wie unter 2.8.7 beschrieben geerntet und die erhaltene Proteinmenge nach Lowry bestimmt. Zur Western-Blot-Analyse wurden je 15 – 25 µg Proteinlysate auf das Gel geladen.

Die Western-Blot-Analysen wurden nach Sambrook (1989), in den Apparaturen Mini-Protean 3 Cell™ bzw. Mini-Trans-Blot Cell™ der Firma Bio-Rad, München, durchgeführt. Dabei wurden die Proteine für die Analyse von HIF- α für 110 min bei 120 V über eine 8%-SDS-PAGE (siehe 2.4.3) aufgetrennt, für die Analyse der V5-markierten Ferrereduktasen für 90 min bei 120 V über eine 12%-SDS-PAGE. Nach der Auftrennung wurden die Proteine elektrophoretisch vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL™, Amersham, Freiburg) übertragen (80 V, 2 h). Nach dem Blotten wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur in 5% Milchpulver in PBS mit 0,1% Tween geblockt. In dieser Lösung folgte auch die anschließende Antikörperinkubation (über Nacht bei 4°C). Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Membranen drei Mal in PBS / 0,1% Tween gewaschen und anschließend mit dem Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Daran schlossen sich drei weitere Waschschritte in PBS / 0,1% Tween an. Die Entwicklung der Blots erfolgte mit dem ECL Western Blotting Detection System™ und ECL plus System™ (Amersham Bioscience, Freiburg).

2.7.8 Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay dient dazu, die Aktivität eines bestimmten Promotors zu untersuchen. Dazu wird hinter die Promotorsequenz an Stelle des ursprünglichen Gens ein Luciferase-Konstrukt kloniert. Die Aktivität des Promotors kann in Folge dessen über die Expression der Luciferase und den daraus resultierenden Umsatz an Luciferin quantifiziert werden.

Die Zellen wurden wie unter 2.8.3 beschrieben auf 24-*Well*-Platten ausgebracht und mit 10 bis 150 ng pro *Well* des jeweiligen Luciferase-Reporter-Konstrukts (pUHC13-3, pVEGF-Luci, pHRE-Luci) sowie 1,5 ng pRL-SV40 als interner Kontrolle transient transfiziert. Nach entsprechender Weiterbehandlung wurden die Zellen 72 h nach der Transfektion nach Herstellerangaben in *passive lysis buffer* aus dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, U.S.A.) geerntet, die Proteinmenge mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay Reagenz (Bio-Rad, München) bestimmt und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die Luminiszenz-Reaktion wurde in einem Luminometer (Lumat LB9507, Berthold, Bad Wildheim) vermessen und in relativen Luminiszenzeinheiten (RLU) angegeben.

2.7.9 Eisenmessung

Der Gehalt von zweiwertigem und dreiwertigem Eisen in den kultivierten Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Reagenzien wurden mittels eines Eisenassays nach Gerald, Berra *et al.* 2004 bestimmt. Dabei wird in jeder Probe sowohl der Gehalt an zweiwertigem Eisen als auch die gesamte Eisenmenge bestimmt, so dass sich aus der Differenz der Gehalt an dreiwertigem Eisen errechnen lässt.

Dazu wurden die Zellen am Vortag geteilt und pro Ansatz 15.000.000 Zellen auf mehrere 10 cm-Zellkulturplatten ausgebracht. Nach der Behandlung und nachfolgender Inkubation wurden die Zellen ein Mal kurz mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in kaltem PBS auf Eis abgeschabt. Diese Suspension wurde abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde das Pellet in 100 µl Wasser aufgenommen und die Suspension halbiert, so dass in einem Reaktionsgefäß der Fe^{2+} -Gehalt der Probe und im anderen Reaktionsgefäß die Menge des gesamten Eisen bestimmt werden konnte. Zu beiden Proben wurde nun 50 µl 1 N HCl zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden einem der beiden Reaktionsgefäße 50 µl Ascorbat (1,14 M) zugegeben, dem anderen 50 µl Wasser. Durch die Zugabe von Ascorbat wird das vorhandene Eisen vollständig zu Fe^{2+} reduziert, so dass sich mit Hilfe dieser Probe der Gesamt-Eisengehalt der Probe bestimmen lässt.

Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde beiden Proben 50 µl Trichloressigsäure (1,23 M) zur Fällung der Proteine zugegeben. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert und 200 µl aus dem Überstand wurden in einer Mikrotiterplatte mit 125 µl Farbreagenz (500 µM Sodium-Bathophenanthrolinsulfonat in 1,2 M Natriumacetatpuffer (pH 4,8))

gemischt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen. Die Messung erfolgte im Elisareader GENios (Tecan, Salzburg, Österreich).

2.7.10 Ferrireduktasen-Assay

Zur Bestimmung der Aktivität eisenreduzierender Enzyme wurde der Ferrireduktasen-Assay nach Ohgami (Ohgami, Campagna *et al.* 2005) eingesetzt. Um zu untersuchen, ob die klonierten Ferrireduktasen-Kandidatengene in den verwendeten Zellen tatsächlich eine eisenreduzierende Aktivität aufweisen, wurden die Zellen wie unter 2.8.3 beschrieben transient mit den Ferrireduktasen transfiziert. Als Kontrolle dienten mit pcDNA transfizierte Zellen. Am folgenden Tag wurden die Zellen zwei Mal mit warmem PBS mit Kalzium und Magnesium (0,9 mM CaCl_2 ; 0,49 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 2,67 mM KCl; 1,47 mM KH_2PO_4 ; 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) gewaschen und anschließend in der Assay-Lösung (5,6 mM Glucose in PBS (mit Kalzium und Magnesium); 50 μM FeCl_3 ; 100 μM Nitrilotriacetic acid; 200 μM Ferrozin) für mehrere Stunden bei 37°C inkubiert. Dabei dient Ferrozin als chromogener Eisenchelator. Die Aktivität der einzelnen Ferrireduktasen im Vergleich zur Kontrolle konnte so photometrisch anhand der Absorption von Ferrozin-cheliertem zweiwertigem Eisen bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt werden.

Um die Aktivierung der endogenen Ferrireduktasen durch Ascorbat und ROS zu untersuchen, wurde der beschriebene Ferrireduktasen-Assay nach Ohgami etwas modifiziert: Es wurden am Vortag pro Ansatz 2.500.000 Zellen auf 10 cm-Zellkulturplatten ausgebracht. Die Zellen wurden dann wie unter 2.8.5 beschrieben für 90 min mit Ascorbat oder H_2O_2 behandelt. Danach wurden sie mit kaltem PBS gewaschen und in PBS abgeschabt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 2300 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 μl Ernte-Puffer (20 mM Tris, pH 7,5; 5 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2) resuspendiert. Zur Lyse wurden die Zellen dann für 30 sec auf Eis mit Ultraschall behandelt. Der Proteingehalt der Lysate wurde anschließend nach der Methode nach Lowry bestimmt. Pro Ansatz wurden 150 μg Protein eingesetzt. Die Proteinlysate wurden wieder mit der Assay-Lösung (s.o.) inkubiert und die Enzymaktivität über die Menge des chelierten Eisens bestimmt.

2.7.11 sonstige Methoden

Restriktionsspaltungen, Ligationen und Agarosegelelektrophorese wurden nach Sambrook (1989) durchgeführt.

2.8 Zellkulturverfahren

Alle in der Zellkultur verwendeten Plastikwaren wurden über die Firma Greiner bio-one (Frickenhausen) bezogen.

2.8.1 Kultivierung von Zellen

Eukaryote Zelllinien wurden in 10 cm-Platten, überschichtet mit 6 ml Zellkulturmedium (DMEM mit 10% FCS und entsprechenden Antibiotika-Konzentrationen), oder in 175 cm² Kulturflaschen, überschichtet mit 20 ml Zellkulturmedium, bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert (Normoxie).

Zur Subkultivierung wurden die Zellen mit warmem PBS gewaschen, anschließend mit ca. 1,5 ml Trypsin überschichtet und bis zum vollständigem Ablösen der Zellen bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann in 10 ml DMEM aufgenommen, abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen auf neue Kulturflaschen verteilt.

2.8.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die konfluenten Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin von der Platte gelöst, in warmem Medium aufgenommen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in FCS mit 10% DMSO resuspendiert und die Zellen sofort in CryoS-Röhrchen (Greiner bio-one, Frickenhausen) transferiert. Diese wurden dann mit Hilfe von Cryo-Freezing Containern (Nalgene, Nalge Nunc, Rochester, NY, U.S.A.) zunächst 1°C / h abgekühlt und nach 72 Stunden in flüssigen Stickstoff transferiert.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und sofort im Wasserbad aufgetaut. 1 ml Zellsuspension in DMSO / FCS wurde in 9 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium gegeben und abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 6 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel vorgenommen.

2.8.3 Transfektionen

Transiente Transfektionen

Für transiente Transfektionen wurden G55TL-Zellen am Vortag geteilt und in einer Dichte von ungefähr 25.000 Zellen/cm² ausgebracht. Für die anschließende Analyse mittels

Western Blot oder für RNA-Präparationen wurden die Zellen in 6-*Well*-Platten kultiviert, für Luciferase-Assays in 24-*Well*-Platten.

Für die Transfektion wurden pro Ansatz im 6-*Well* 1,5 µg DNA in 50 µl DMEM aufgenommen und mit der sechsfachen Menge SuperFect™ (Qiagen, Hilden) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit warmem PBS gewaschen. Anschließend wurde die DNA-Superfect™-Mischung zusammen mit 0,5 ml Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 3 h bei 37°C inkubiert, dann wurden sie mit warmem PBS gewaschen und bis zur Ernte nach 24 - 48 h in frischem Zellkulturmedium inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem "leeren" pcDNA-Vektor transfiziert worden waren. Wenn die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Plasmid-DNA transfiziert wurden, so wurde zu den geringeren Konzentrationen so viel pcDNA hinzugefügt, dass die transfizierte DNA-Menge in allen Ansätzen gleich war. Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz wurde jeweils ein *Well* mit der gleichen Menge pECFP-C1 transfiziert. Die Transfektionseffizienz konnte so am nächsten Tag über die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen pro *Well* bestimmt werden. Lag sie unter 70%, so wurde der Versuch nicht weiter ausgewertet.

Stabile Transfektionen

Für stabile Transfektionen wurden die G55TL-Zellen am Vortag geteilt und in einer Dichte von ungefähr 25.000 Zellen/cm² auf 10 cm-Platten ausgebracht.

Für die Transfektionen wurden 10 µg endotoxinfrei geprüptes und linearisiertes Plasmid in 100 µl DMEM mit 60 µl SuperFect™ gemischt und wie für die transienten Transfektionen auf die Zellen gegeben. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen dann in Zellkulturmedium auf je eine 10 cm-Platte im Verhältnis 1:5, 1:10 und 1:20 geteilt. Am darauf folgenden Tag wurde ein Mediumwechsel mit Selektionsmedium, das die entsprechenden Antibiotika enthielt, durchgeführt. Im Laufe der nächsten zwei bis drei Wochen starben die nicht resistenten Zellen ab und solche, die durch die Transfektion das Resistenzgen integriert hatten, bildeten Kolonien. Sobald diese Kolonien eine Durchschnittsgröße von 3 – 5 mm erreicht hatten, wurden sie mit einer Pipettenspitze aufgenommen und die Einzelkolonien in 96-*well*-Platten in Selektionsmedium weiter kultiviert.

Tet-ON™-System (Gossen und Bujard 1992)

Um doppelt stabil transfizierte Tet-ON-Zellen, die sowohl das Regulations- als auch das Response-Plasmid enthalten, zu erhalten, wurde folgendermaßen vorgegangen:

Die verwendeten G55TL-Zellen wurden zunächst wie unter 2.8.3 beschrieben mit 10 µg des pTet-tTS-Plasmids und 1 µg des Regulationsplasmids pTet-ON transfiziert. Transfizierte Zellen konnten anhand ihrer Resistenz gegen das Antibiotikum G418, für die pTet-tTS codiert, identifiziert werden. Nach Isolierung und Kultivierung wurden diese Zellen mit Hilfe des Tet-induzierbaren Luciferase-Reporter-Konstrukts pUHC 13-3 auf die Induzierbarkeit des Transgens sowie auf eine niedrige Hintergrund-Expression hin untersucht.

Zu diesem Zweck wurden von jeder untersuchten Zelllinie zwischen dreißig und fünfzig Zellklone transient mit dem Luciferase-Reporter-Konstrukt sowie dem pRL-SV40-Plasmid transfiziert. Am Tag nach der Transfektion wurde dem Zellkulturmedium für zwei Tage bis zur Ernte Doxycyclin in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Die Zellklone, die im Luciferase-Assay in drei Wiederholungsversuchen die höchste Induktion der Reporter-gen-Aktivität bei einer niedrigen Hintergrundaktivität zeigten, wurden im Anschluss mit 10 µg des jeweiligen Responseplasmids pTRE2 (in Kombination mit pTKhygro) bzw. pTRE2hygro, das ein HIF-Konstrukt bzw. das GFP codierende Gen enthielt, transfiziert. Transfizierte Zellen konnten hier anhand ihrer Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin identifiziert werden. Die Anwesenheit des Transgens wurde mittels einer Genotyping-PCR verifiziert. In den Zellen, in denen dies nachgewiesen werden konnte, wurde dann die Induzierbarkeit der Expression mittels semiquantitativer RT-PCR überprüft. Solche Klone, die eine Induzierbarkeit zeigten, wurden mittels Northern Blot und später auch mittels quantitativer *real time* PCR weiter untersucht. Des Weiteren wurde die Expression auch auf Proteinebene mit Hilfe von Western Blots untersucht.

Die Induzierbarkeit in den pTRE2hygro-GFP-Zelllinien wurde visuell überprüft, da sich die Expression des Transgens an der Fluoreszenz in den Zellen unter UV-Licht erkennen lässt.

2.8.4 siRNA-Transfektion

Um die Expression von Genen zu inhibieren ("*knock down*"), wurde die siRNA-Technik verwendet. Dabei bringt man kurze, doppelsträngige RNAs mit einer Länge von 21 bis 23

Nukleotiden, so genannte siRNAs ("*small interfering RNAs*"), in die Zellen ein. Die siRNAs fungieren dort als Leitmotiv für eine Nuklease, was zum Abbau der komplementären mRNA-Sequenz des Zielgens führt, so dass die Proteintranslation unterbleibt (Elbashir, Harborth *et al.* 2001).

Zur Herstellung der siRNAs wurde der Silencer™ siRNA Construction Kit (Ambion, Austin, TX, U.S.A.) sowie die unter 2.1.4 genannten Oligonukleotide eingesetzt. Die damit synthetisierten siRNAs wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Um Zellen zu transfizieren, wurden diese am Vortag geteilt und in einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² in 6-Well-Platten ausgebracht. Für die Transfektion, die an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt wurde, wurden pro Well in der Regel 100 nM siRNA verwendet. Die siRNA wurde dazu in 144 µl OptiMEM®-Medium verdünnt, ebenso das Transfektionsreagenz Oligofectamine (2,5 µl Oligofectamine in 13,5 µl OptiMEM®). Beide Ansätze wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend vereinigt. Diese Mischung wurde dann weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit warmem DMEM ohne FCS gewaschen. Dann wurde die siRNA-Oligofectamine-Mischung zusammen mit 640 µl DMEM auf die Zellen gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 4 h wurden 400 µl DMEM mit 30% FCS zugegeben, so dass die FCS-Endkonzentration wieder bei 10% lag. Am Tag nach der zweiten Transfektion wurden die Zellen geerntet.

Um die Effizienz des *knock downs* zu testen, wurden quantitative RT-PCRs durchgeführt. Für den *knock down* der Ferrireduktasen und von HIF-1α als Kontrolle wurden jeweils pro Gen zwei verschiedene siRNA-Sequenzen getestet. Die Sequenz mit dem stärkeren Effekt wurde zur weiteren Verwendung ausgewählt. Als Kontrolle diente eine siRNA-Sequenz gegen *sima*, das Drosophila-Homolog von HIF. Diese Sequenz zeigte in einem Datenbankvergleich keine Homologie zum humanen Gen. Alle verwendeten Sequenzen führten zu einer Verringerung der Expression von mindestens 70%.

2.8.5 Behandlung von Zellen mit Inhibitoren und anderen Reagenzien

Zur Untersuchung des Effekts von verschiedenen Reagenzien wie Inhibitoren von Stoffwechselwegen oder reaktiven Sauerstoffradikalen auf die Expressionsmuster der Zellen wurden diese Substanzen (alle Sigma, Taufkirchen) wie folgt als konzentrierte Ausgangslösungen angesetzt und auf ihre Endkonzentration mit Zellkulturmedium verdünnt und dann auf die Zellen gegeben.

DP (2,2'-Bipyridyl)	100mM in Methanol
DFO (Deferoxamine)	100mM in sterilem Aqua bidest.
DMOG (Dimethyloxalylglycin)	1 M in DMSO
H₂O₂ (Wasserstoffperoxid); 37%	10mM in sterilem Aqua bidest.
Ascorbat	0,5 M in sterilem Aqua bidest.
3-Amino-1,2,4-Triazol	0,5 M in sterilem Aqua bidest.
DPI (Diphenyleneiodonium chloride)	10 mM in DMSO
NMPG (N-(2-Mercaptopropionyl)glycin)	1 M in sterilem Aqua bidest.
Apocynin	100mM in sterilem Aqua bidest.

2.8.6 Hypoxie-Behandlung

Zur Untersuchung des Effekts von Hypoxie wurden die Zellen direkt vor Versuchsbeginn, wenn nicht anders erwähnt, einem Mediumwechsel unterzogen und anschließend sofort in eine Hypoxie-Kammer (Labotect Inkubator C42) gestellt. Hier wurden sie bei 37°C, 5% CO₂ sowie 1% O₂ für die angegebenen Zeiten inkubiert.

2.8.7 Zellernte zur Proteinanalyse mittels Western Blot

Zur Analyse von Proteinen mittels Western Blot wurden die Zellen am Vortag geteilt und in einer Dichte von ungefähr 25.000 Zellen/cm² im 6-Well ausgebracht. Nach entsprechender Behandlung (siehe unter 2.8.5 und 2.8.6) wurden sie wie folgt geerntet: Die Zellen wurden ein Mal kurz mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 0,5 ml kaltem PBS auf Eis abgeschabt. Diese Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 2300 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Lysispuffer (8 M Harnstoff-Lösung, 10% vol Glycerin, 1% SDS, 5 mM DTT, 10 mM Tris pH 6,8, 50 mM PMSF, Complete Mini™ Protease Inhibitor Mix (Roche, Mannheim)) resuspendiert. Die Suspension wurde dann bei -20°C eingefroren.

Zur Analyse der Proteine wurden die Lysate für 15 min bei 95°C auf dem Heizblock erhitzt, anschließend auf Eis wieder abgekühlt und die Konzentration mit Hilfe des DC-Protein Reagents Package™ von Bio-Rad (München) nach der Methode von Lowry, Rosebrough *et al.* (1951) bestimmt.

Zum Laden wurden die Proben mit 5 µl β-Mercaptoethanol und 5 µl Bromphenolblau versetzt.

2.8.8 Immunhistochemie

Für den immunohistochemischen Nachweis von Proteinen wurden 20.000 Zellen pro *Well* in einer 24-*Well*-Platte mit Collagen-beschichteten Deckgläsern (\varnothing 13 mm) ausgebracht. Für die Beschichtung wurden die Deckgläser vor dem Ausbringen der Zellen für 30 min bei Raumtemperatur mit Collagen (Sigma, Taufkirchen; Ausgangslösung in 0,1% Essigsäure gelöst; dann 1:100 in sterilem Aqua bidest. verdünnt) inkubiert und anschließend kurz mit PBS gewaschen. Nach 24 h erfolgte entweder eine Inkubation unter Hypoxie oder eine Superfect™-Transfektion der Zellen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit Methanol. Die Zellen wurden hierzu ein Mal mit 0,01 M PBS gewaschen und mit 100% Methanol überschichtet. Nach 20 min Inkubation bei 4°C wurde das Methanol abgesaugt und die Zellen für weitere 5 min bei 4°C in 50% Methanol inkubiert. Anschließend wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen und für 10 min bei Raumtemperatur mit 0,1% Triton / 0,01 M PBS permeabilisiert. Dann folgte eine 30minütige Inkubation mit *Blocking* Reagenz (5% BSA / PBS / 0,01% Triton). Das Reagenz wurde anschließend verworfen und die Zellen mit dem entsprechenden Primärantikörper in BSA / PBS für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit 0,01 M PBS und einer weiteren Inkubation mit *Blocking* Reagenz folgte die Inkubation mit Alexa-gekoppelten Sekundärantikörpern für 2 h. Anschließend wurden die Zellen wiederum dreimal mit PBS gewaschen, dann wurde DAPI zur Anfärbung des Kerns (Verdünnung 1:1000) zugesetzt. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Deckgläser mittels AquaPolyMount™ (Polyscience, Warrington, PA, U.S.A.) auf Objektträgern eingebettet und im Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus BX51) analysiert.

2.9 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurde der ungepaarte Student's t-Test zum Vergleich zwischen verschiedenen Behandlungen oder Transfektionen verwendet. Die Daten sind als Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung angegeben. Ein *p*-Wert <0,05 wurde als signifikant betrachtet (*), ein *p*-Wert <0,001 als hochsignifikant (**).

3 Ergebnisse

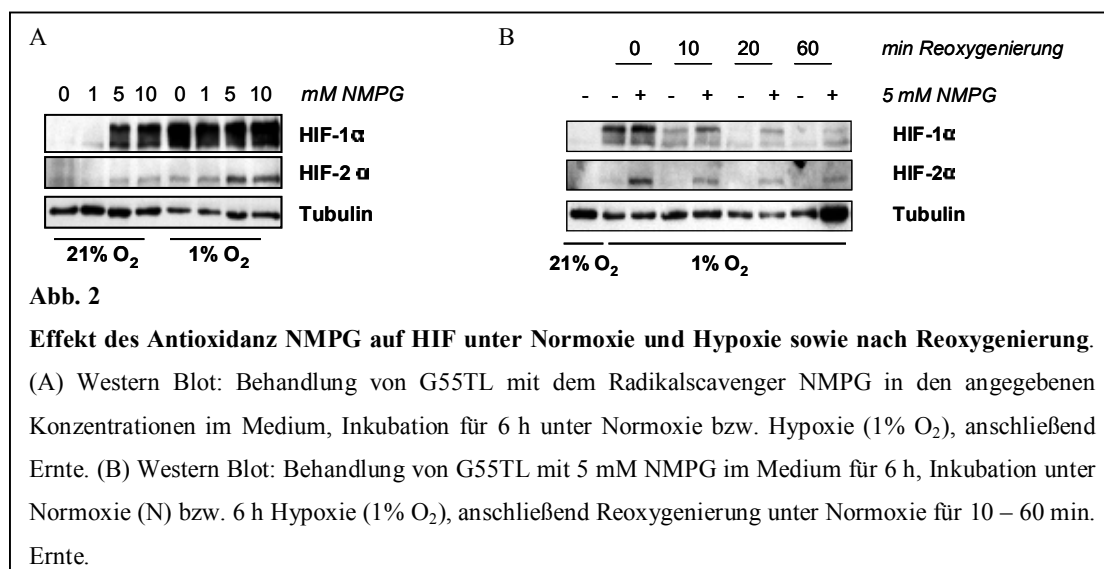
3.1 Regulation von HIF durch Sauerstoffradikale

3.1.1 Induktion und Stabilisierung von HIF durch ein Antioxidationsmittel

Die Rolle von Sauerstoffradikalen in der Regulation von HIF wird, wie einleitend bereits erwähnt, in der Literatur kontrovers diskutiert. Um den Einfluss von ROS auf die Regulation von HIF zu untersuchen, wurden Glioblastomzellen zunächst mit einem Antioxidanz, dem Radikalscavenger NMPG (N-(2-Mercaptopropionyl)glycin) behandelt (Wiesener, Turley *et al.* 1998; Salceda und Caro 1997). NMPG enthält eine Thiolgruppe, die als e^- -Donorgruppe fungieren kann (Horwitz und Sherman 2001). Unter physiologischen Bedingungen werden Sauerstoffradikale vor allem unter zwei Voraussetzungen gebildet: unter Normoxie durch das Enzym NADPH-Oxidase und durch die mitochondriale Atmungskette. Während einer Reoxygenierungsphase, d.h. nachdem Zellen oder ein Gewebe eine hypoxische Phase durchlaufen haben und wieder zu einem physiologischen pO_2 zurückkehren, geschieht dies durch die Xanthin-Dehydrogenase/Oxidase und ebenfalls durch Enzyme der mitochondrialen Atmungskette (Reviews: Li und Jackson 2002; White 2006). Unter beiden Bedingungen ist normalerweise kein HIF in Zellen nachweisbar. Durch Behandlung der Zellen mit dem ROS-Scavenger sinkt die Konzentration an Sauerstoffradikalen in der Zelle. Um die Folgen dieser Behandlung zu untersuchen, wurde NMPG in verschiedenen Konzentrationen dem Zellkulturmedium zugegeben und die Zellen wurden unter Normoxie und Hypoxie inkubiert. Wie in Abb. 2A zu sehen, ist in der Folge in NMPG-behandelten G55TL-Zellen HIF auch unter normoxischen Bedingungen detektierbar. Selbst unter hypoxischen Bedingungen führt die Behandlung mit dem Antioxidanz zu einer weiteren Stabilisierung von HIF-2 α . Die HIF-1 α -Proteinmenge scheint dagegen nicht weiter anzusteigen. Eine sehr hohe Expression von HIF-2 α scheint zu einer Reduktion der HIF-1 α -Proteinmenge unter Hypoxie zu führen (und umgekehrt). Eine solche reziproke Regulation wurde mehrmals beobachtet (siehe auch unter 3.4.2) und deutet auf eine gegenseitige Beeinflussung der Proteinexpression von HIF-1 α und HIF-2 α hin.

Des Weiteren führt eine Behandlung mit NMPG auch bei einer Reoxygenierung zu einer Stabilisierung von HIF (Abb. 2B). Hierzu wurden die Zellen mit 5 mM NMPG im Zell-

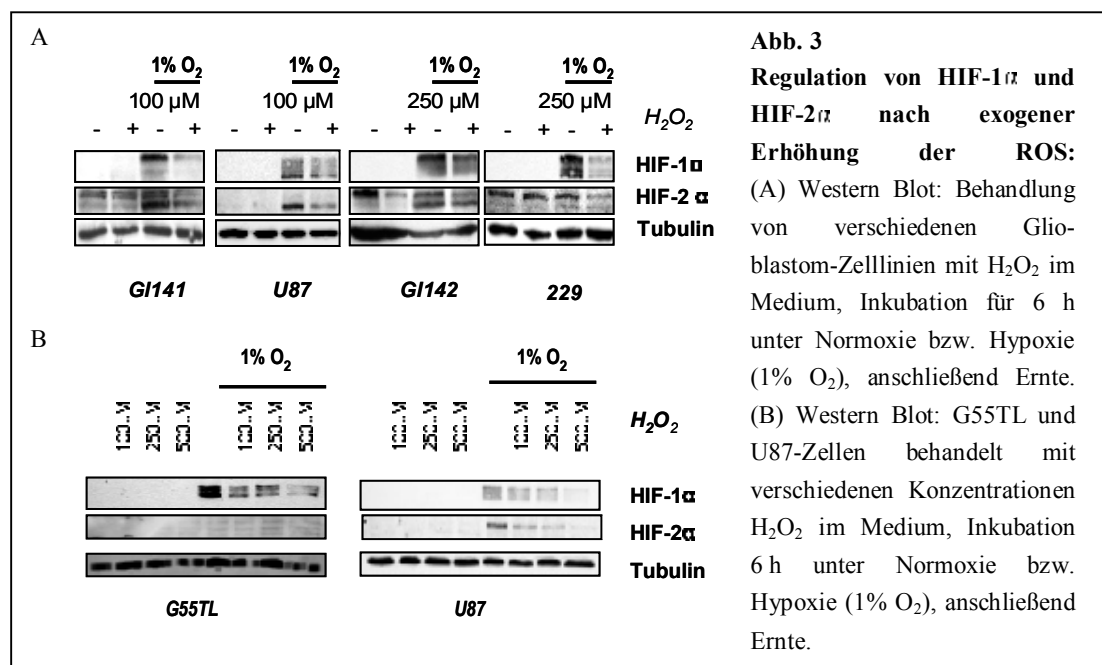
kulturmedium für 6 h unter hypoxischen Bedingungen inkubiert, anschließend wurden sie für verschiedene Zeitspannen zwischen 10 und 60 min reoxygeniert. Es ist deutlich zu erkennen, dass das durch Hypoxie-Behandlung induzierte HIF schon nach 10 min Inkubation unter normoxischen Bedingungen stark abgebaut wird. Bei Zugabe des *Scavengers* dagegen bleibt das Protein für fast 60 min nachweisbar. Eine Reduktion der Sauerstoffradikale durch den *Scavenger* NMPG führt also zu einem verminderten Abbau von HIF nach einer Reoxygenierung. Diese Versuche deuten somit an, dass Sauerstoffradikale unter Normoxie und Hypoxie sowie bei Reoxygenierung zur Destabilisierung von HIF führen.



3.1.2 Regulation von HIF durch Erhöhung der Sauerstoffradikale

Um die Rolle von Sauerstoffradikalen weiter zu untersuchen, wurde der ROS-Gehalt im nächsten Versuch exogen erhöht. Dazu wurde Wasserstoffperoxid (H₂O₂) dem Zellkulturmedium zugegeben und die Zellen damit für 6 h unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen inkubiert. Man sieht in den untersuchten Glioblastom-Zelllinien eine deutliche Verminderung sowohl von HIF-1α als auch von HIF-2α nach ROS-Behandlung (Abb. 3). In Abb. 3A ist in den Zelllinien G141, U87 und 229 die Verringerung der HIF-1α-Proteinmenge unter Hypoxie besonders deutlich. In U87 ist darüber hinaus auch ein Abbau von HIF-2α unter Normoxie zu sehen. Die untersuchten Zelllinien zeigten dabei eine unterschiedliche Sensitivität, teilweise führte schon eine Zugabe von 100 μM H₂O₂ zu einem Abbau von HIF (G141, U87), teilweise erst eine Dosis von 250 μM (G142, 229).

Die Regulation von HIF- α ist des Weiteren auch dosisabhängig, wie in Abb. 3B für zwei Zelllinien, G55TL und U87, die mit ansteigenden H₂O₂-Konzentrationen (100 μ M, 250 μ M, 500 μ M) behandelt wurden, exemplarisch gezeigt.

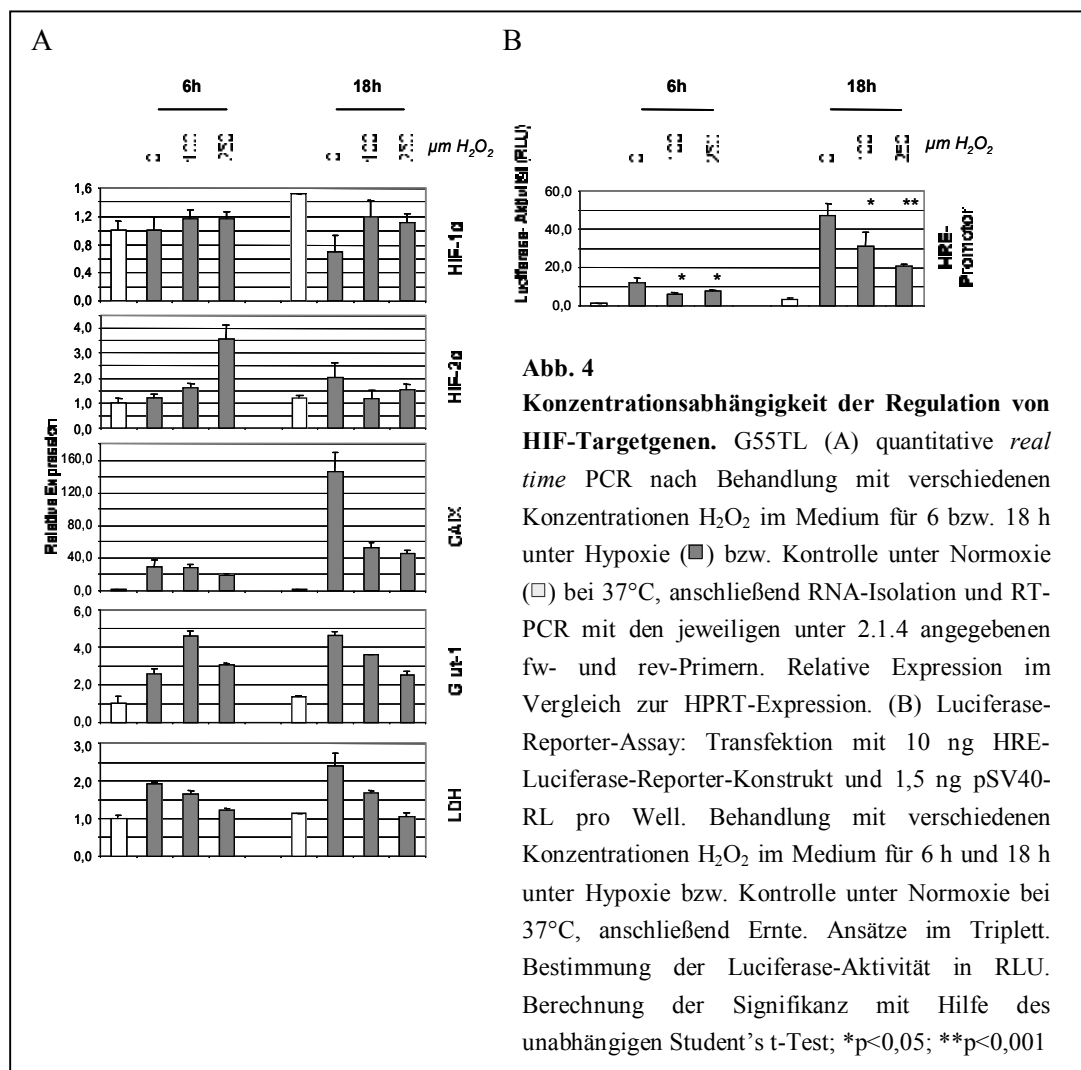


Um die biologische Relevanz des regulatorischen Effekts von ROS auf HIF-1 α und HIF-2 α zu prüfen, wurde weiter untersucht, wie sich dieser Effekt auf die Expression von HIF-Targetgenen auswirkt. Dazu wurde eine quantitative *real time* PCR und ein Luciferase-Reporter-Assays durchgeführt. Die quantitative *real time* PCR ermöglicht eine Bestimmung der relativen Expressionshöhe der untersuchten Gene, da die Expressionshöhe des untersuchten und unterschiedlich exprimierten Gens mit der eines nicht-regulierten Haushaltgens wie HPRT (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase*) verrechnet wird. So konnte die relative Expression von HIF-1 α und HIF-2 α sowie repräsentativer HIF-Targetgene wie CA IX, GLUT-1 und LDH im Verhältnis zur Expression des Haushaltgens HPRT untersucht werden. Dazu wurden die Zellen erneut mit verschiedenen Konzentrationen H₂O₂ im Zellkulturmedium behandelt und für 6 bzw. 18 h unter Hypoxie inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, RNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Abbildung 4 zeigt, dass die mRNA-Expression von HIF-1 α durch die Zugabe von Sauerstoffradikalen nicht verändert wird, die Expression von HIF-2 α -mRNA steigt sogar leicht an. Die reduzierte Proteinmenge, die im Western Blot detektiert wird, ist also auf eine posttranskriptionelle Regulation zurückzuführen. Abbildung 4 zeigt außerdem, dass alle untersuchten HIF-Targetgene durch Inkubation

unter Hypoxie sowohl für 6 h als auch für 18 h induziert werden. Die Induktionshöhe der einzelnen Gene variiert dabei stark zwischen einer Verdoppelung der relativen LDH-Expression unter Hypoxie bis hin zu einer 120fach höheren Expression unter Hypoxie von CA IX. Diese Induktion wird vor allem während der längeren Inkubationszeit durch die Anwesenheit von Wasserstoffperoxid dosisabhängig signifikant reduziert.

Des Weiteren wurde auch die Aktivität eines HRE-Promotor-Reporters in An- bzw. Abwesenheit von H_2O_2 in einem Luciferase-Reporter-Assay untersucht. Das HRE-Reporter-Konstrukt besteht aus drei Wiederholungen des *Hypoxia-responsive element* HRE aus der Promotorregion des HIF-Targetgens EPO. Die Bindungsstelle für den Transaktivator Sp1 ist dabei deletiert. Eine Aktivierung führt zur Expression des dahinter klonierten Luciferase-Konstrukts, so dass die Promotoraktivität über eine Zunahme der Luciferase-Aktivität bestimmt werden kann. Für diesen Versuch wurden die Zellen, wie unter 2.7.8 beschrieben, transient mit dem HRE-Luciferase-Reporter sowie einem Renilla-Luciferase-Konstrukt zur internen Kontrolle transfiziert. Dann wurden sie in Anwesenheit von H_2O_2 für 6 h bzw. 18 h unter Hypoxie inkubiert und anschließend die Reporteraktivität bestimmt. Diese sinkt, wie in Abb. 4B zu sehen, konzentrationsabhängig – die Inkubation mit 100 μM H_2O_2 führt zu einer Halbierung der Reporter-Aktivität nach 18 h, eine höhere Dosis von 250 μM zu einer weiteren Verringerung.

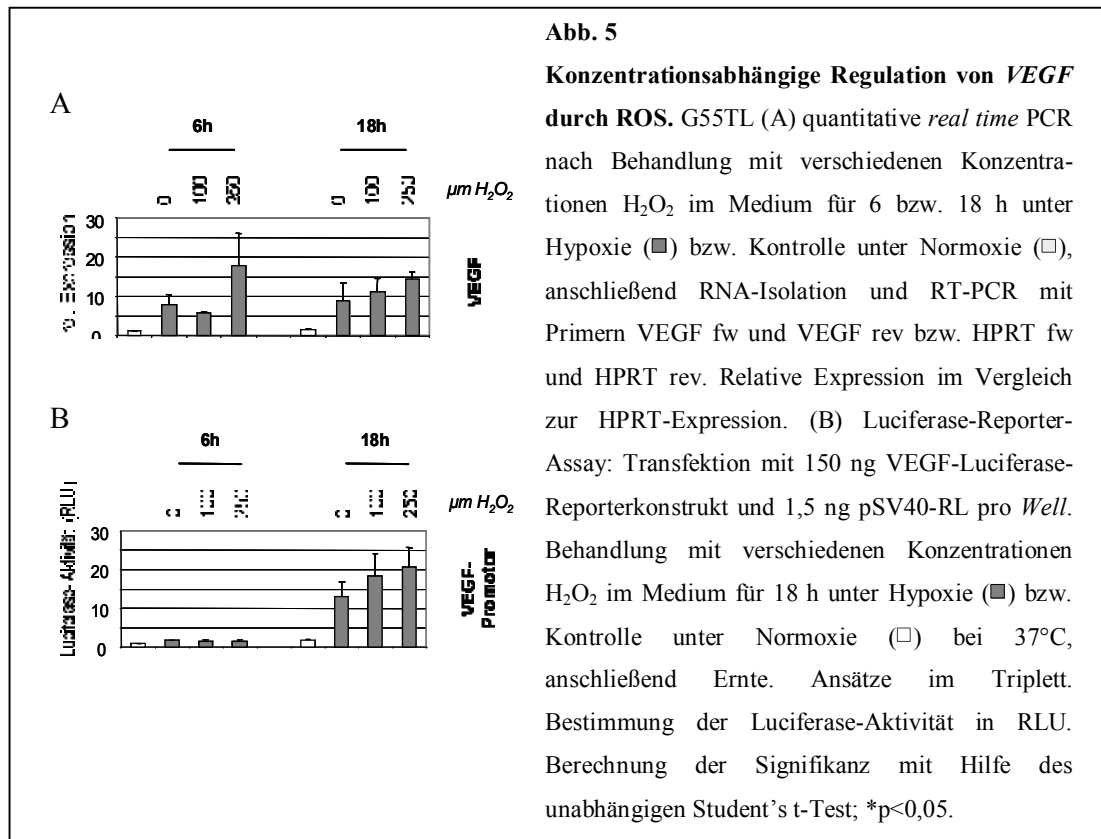
Diese Versuche zeigen, dass die HIF-Proteinmenge in Zellen, die unter 1% Sauerstoff kultiviert werden, durch eine Erhöhung der Sauerstoffradikale im Medium reduziert wird. Diese Regulation ist sowohl auf HIF-Proteinebene als auch bei der Expression von HIF-Targetgenen zu beobachten. Die HIF-mRNA-Expression bleibt unbeeinflusst.



3.1.3 Regulation von VEGF durch ROS

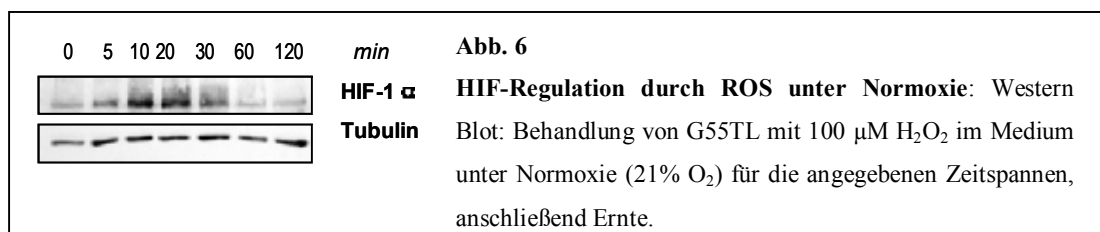
Im Laufe der beschriebenen Versuche wurde auch der Einfluss von ROS auf VEGF, ein weiteres HIF-Targetgen, untersucht. Dabei zeigte sich, dass VEGF einer anderen Regulation nach ROS-Gabe als die übrigen untersuchten Gene unterliegt: Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, steigt die VEGF-mRNA-Menge unter Hypoxie wie zu erwarten sowohl nach 6 h wie auch nach 18 h auf das acht- bis zehnfache des Normoxiewertes an. Nach H_2O_2 -Gabe unter Hypoxie steigen die Werte jedoch dosisabhängig noch weiter (bei 250 μM nach 6 h auf das Doppelte der unbehandelten Zellen, nach 18 h bei gleicher H_2O_2 -Menge auf das 1,5fache). Auch im Luciferase-Reporter-Assay ist bei Verwendung eines VEGF-Promotor-Reporters, der die Sp1-Bindungsstelle enthält, eine Erhöhung der Luciferase-Aktivität zu erkennen. Wie Abbildung 5B zeigt, steigt die Aktivität nach 18 h

Inkubation unter Hypoxie ohne H_2O_2 auf das 13fache an, nach Zugabe von 100 μM bzw. 250 μM H_2O_2 ist ein weiterer Anstieg auf das 18fache bzw. 21fache zu beobachten. Der Anstieg ist zwar mit $p > 0,05$ nicht statistisch signifikant, die Tendenz jedoch in mehreren Versuchen reproduzierbar.



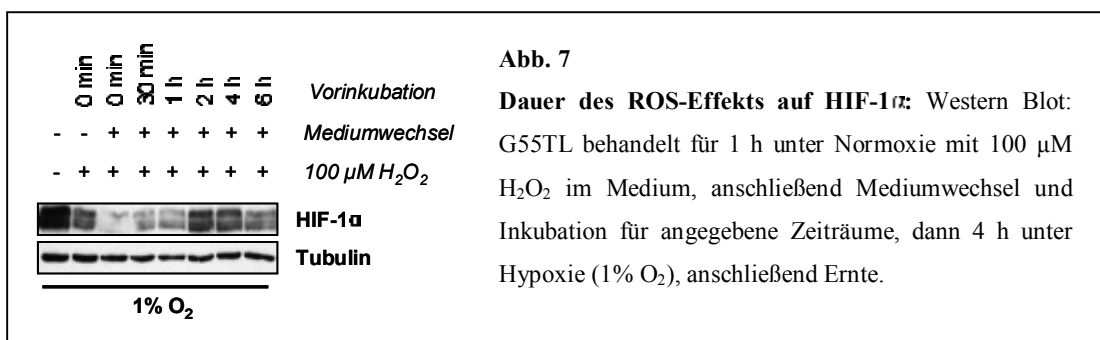
3.1.4 Regulation von HIF durch ROS unter Normoxie

In der Literatur wird die Wirkung von Sauerstoffradikalen kontrovers diskutiert. So gibt es einige Beobachtungen (Richard, Berra *et al.* 2000; Haddad und Land 2001; BelAiba, Djordjevic *et al.* 2004), nach denen eine Zugabe von Sauerstoffradikalen unter Normoxie zu einer Erhöhung der HIF-Proteinmenge führt. Um dies zu untersuchen, wurden G55TL-Glioblastomzellen mit 100 μM H_2O_2 im Medium behandelt und nach kurzen Zeiträumen (5 min bis 120 min) Protein geerntet. Abbildung 6 zeigt, dass es nach H_2O_2 -Behandlung unter Normoxie zu einer kurzfristigen Stabilisierung von HIF kommt. Diese Stabilisierung ist nur in den ersten 30 min nach der exogenen Erhöhung von ROS zu beobachten, danach wird HIF wieder destabilisiert und abgebaut.



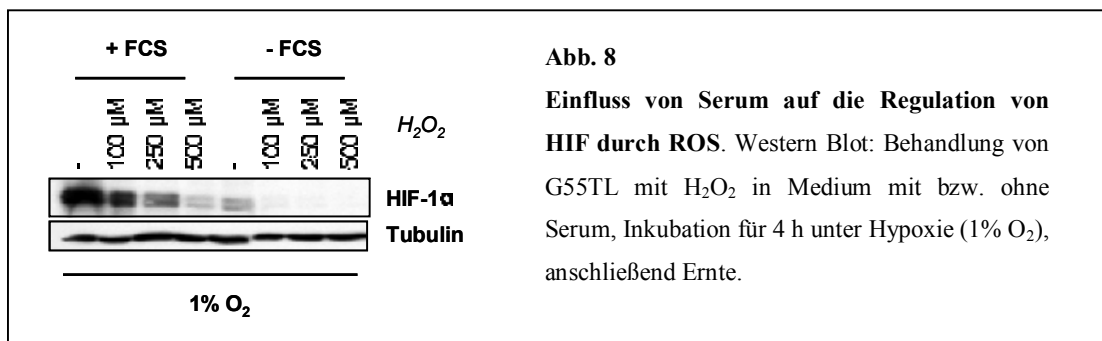
3.2 Zeitdauer des ROS-Effekts, Serumeffekte und Toxizität

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte von ROS durch Toxizität des zugegebenen Wasserstoffperoxids hervorgerufen wurden, wurde folgender Versuch durchgeführt: Die Zellen wurden für 1 h unter Normoxie mit 100 μM H₂O₂ behandelt, anschließend wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, dann wurden die Zellen für verschiedene Zeiträume zwischen 30 min und 6 h weiter unter Normoxie inkubiert und erst im Anschluss daran für 4 h unter hypoxischen Bedingungen inkubiert. Wie man in Abb. 7 sieht, ist bei einer kürzeren Vorinkubation von 0 bis 2 h eine deutliche Reduktion von HIF zu erkennen, nach diesem Zeitraum lässt der Effekt jedoch nach. Nach 2 h Vorinkubation ist die Proteinmenge wieder vergleichbar mit der unbehandelten Kontrolle. Dieser Versuch zeigt, dass der destabilisierende Effekt von ROS auf HIF auf bis zu 2 h prolongiert ist, er aber nicht an die Anwesenheit von H₂O₂ gebunden ist. Die transiente Natur des Effekts zeigt zudem, dass es sich nicht um eine Folge erhöhter Toxizität handelt.



Um im Weiteren auszuschließen, dass die Ursache der beobachteten Regulationen nicht die unter Umständen im Serum enthaltene Katalase, die die Reaktion $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ katalysiert, ist, sondern es sich um einen direkt durch H₂O₂ verursachten Effekt handelt, wurden ebenfalls mehrere Kontrollversuche durchgeführt. Es handelt sich bei Katalase um ein temperatursensitives Enzym, so dass die im Serum enthaltene Katalase durch die im Labor routinemäßig durchgeführte Inaktivierung des Serums bei 60°C schon denaturiert

sein sollte. Trotzdem wurde zur Kontrolle ein Versuch in serumfreiem Medium durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in Ab- bzw. Anwesenheit von 10% Serum im Medium für eine Stunde mit verschiedenen Konzentrationen H_2O_2 behandelt und die Zellen für 4 h unter Hypoxie inkubiert. Abb. 8 zeigt, dass die Abwesenheit von Serum sogar zu einer leichten Verstärkung des HIF-Abbaus führt. Keinesfalls aber führt eventuell im Serum vorhandene Katalase zu dem beobachteten Effekt. In einem weiteren Kontrollversuch wurden die Zellen in normalem serumhaltigem Medium, in serumfreiem Medium sowie in Anwesenheit des Katalase-Inhibitors Aminotriazol (Margoliash, Novogrodsky *et al.* 1960; Fandrey, Frede *et al.* 1994) wieder mit H_2O_2 in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach 1 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen unter Hypoxie inkubiert. Auch dies zeigte keine Veränderung (nicht gezeigt). Mit diesen Versuchen kann ausgeschlossen werden, dass die Anwesenheit von Katalase im Serum zu einer Produktion von molekularem Sauerstoff im Medium führt. Die Daten deuten eher auf eine protektive Rolle des Serums im Medium hin, da der "ROS-Effekt" bei serumfreier Versuchsdurchführung noch verstärkt zu werden scheint.

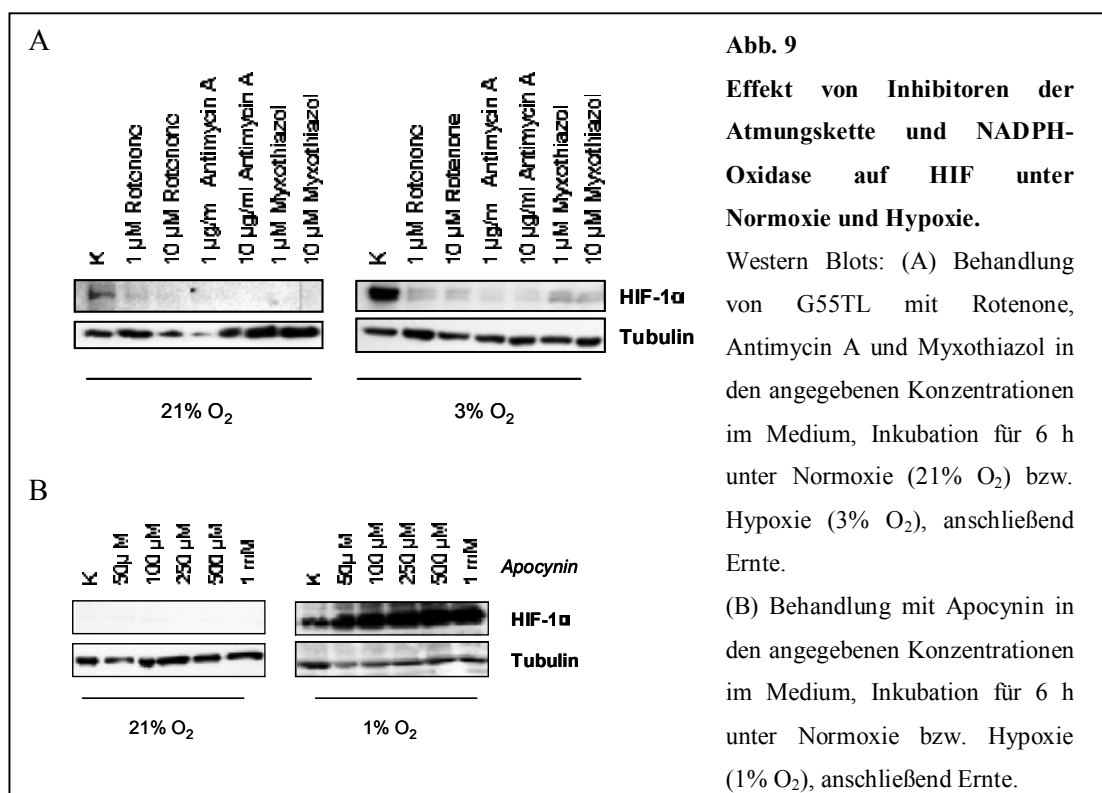


3.3 Herkunft der Sauerstoffradikale

Zum Bildungsort der HIF-regulierenden Sauerstoffradikale gibt es in der Literatur verschiedene Modelle: So gibt es Studien, die für eine Rolle der mitochondrialen Atmungskette sprechen und andere, die eine Bildung durch die NADPH-Oxidase befürworten. Um den der HIF-Destabilisierung durch ROS zu Grunde liegenden Mechanismus weiter zu untersuchen, wurde die Wirkung verschiedener Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette sowie der NADPH-Oxidase unter Hypoxie untersucht.

Zu diesem Zweck wurden die einzelnen Komponenten der Atmungskette durch spezifische Inhibitoren gehemmt. Die Zellen wurden für 6 h unter Normoxie bzw. Hypoxie mit den

Inhibitoren Rotenone (Komplex I), Antimycin A und Myxothiazol (Q_0 bzw. Q_1 im Komplex III) in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Dabei sollte die jeweils niedrigere verwendete Konzentration schon für eine vollständige Inhibition der Elektronentransportkette ausreichend sein (Doege, Heine *et al.* 2005). Keiner dieser Inhibitoren induzierte unter Normoxie detektierbare Mengen an HIF-1 α (Abb. 9A). Bei einer Inkubation unter Hypoxie (1% O_2) war ebenfalls kein deutlicher Effekt zu sehen (nicht gezeigt), unter milder Hypoxie (3% O_2) dagegen führten die Inhibitoren zu einer Destabilisierung von HIF im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 9A).

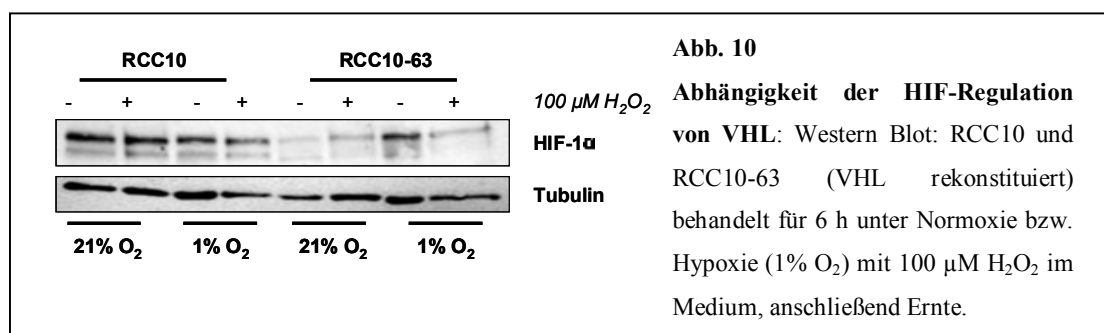


Um die Rolle der ROS-Produktion durch die NADPH-Oxidase zu untersuchen, wurde das Enzym durch den spezifischen Inhibitor Apocynin gehemmt. Dazu wurde Apocynin in verschiedenen Konzentrationen dem Medium zugegeben und die Zellen unter Normoxie und Hypoxie (1% O_2) inkubiert. Wie in Abb. 9B zu sehen, führte eine Inhibition der NADPH-Oxidase zu einer dosisabhängigen Stabilisierung von HIF-1 α unter Hypoxie, unter Normoxie war kein Effekt zu sehen.

3.4 Abhängigkeit der HIF-Regulation durch ROS von VHL und den Prolylhydroxylasen

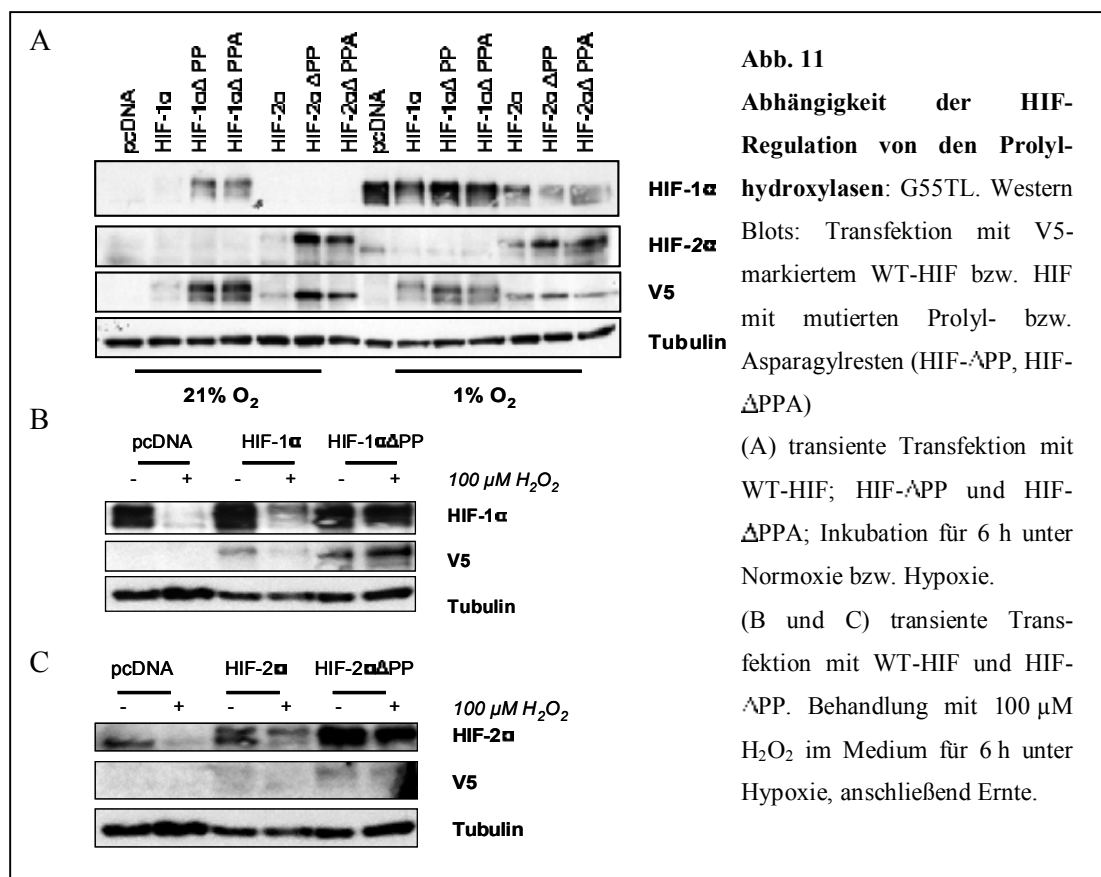
3.4.1 Abhängigkeit von VHL

Um den der Regulation von HIF durch Sauerstoffradikale zu Grunde liegenden Mechanismus weiter zu untersuchen, wurden verschiedene Zellmodelle eingesetzt, in denen an der HIF-Regulation beteiligte Faktoren defekt sind. Mittels einer Nierenzellkarzinomlinie (RCC10), die VHL-defizient ist und somit konstitutiv HIF exprimiert, und einer weiteren Linie, in der VHL rekonstituiert wurde (RCC10-63) (Krieg, Haas *et al.* 2000) konnte die Abhängigkeit dieses „ROS-Effekts“ von VHL untersucht werden. Dazu wurden beide Zelllinien mit H_2O_2 behandelt, unter Normoxie bzw. Hypoxie inkubiert und anschließend mittels Western Blot untersucht. Wie in Abb. 10 zu sehen ist, wird HIF-1 α und HIF-2 α in den RCC10-Zellen wie zu erwarten nicht nur unter Hypoxie, sondern auch unter Normoxie stabilisiert. Darüber hinaus unterliegt es keiner sauerstoffabhängigen Regulation mehr. In RCC10-63 (*VHL*^{+/+}) dagegen ist HIF nur unter hypoxischen Bedingungen nachweisbar, unter Normoxie wird das Protein abgebaut. Nach Behandlung mit H_2O_2 zeigt sich, dass die ROS-Sensitivität der HIF-Expression vom VHL-Status der Zellen abhängig ist: In den VHL-defizienten RCC10-Zellen bleibt die HIF-Proteinmenge nach H_2O_2 -Behandlung unverändert, in RCC10-63 dagegen führt die H_2O_2 -Zugabe zu einer Verringerung des Hypoxie-induzierten HIF-Proteins. Diese Befunde legen nahe, dass VHL den durch ROS-Zugabe induzierten Proteinabbau mediiert.



3.4.2 Abhängigkeit von den Prolylhydroxylasen

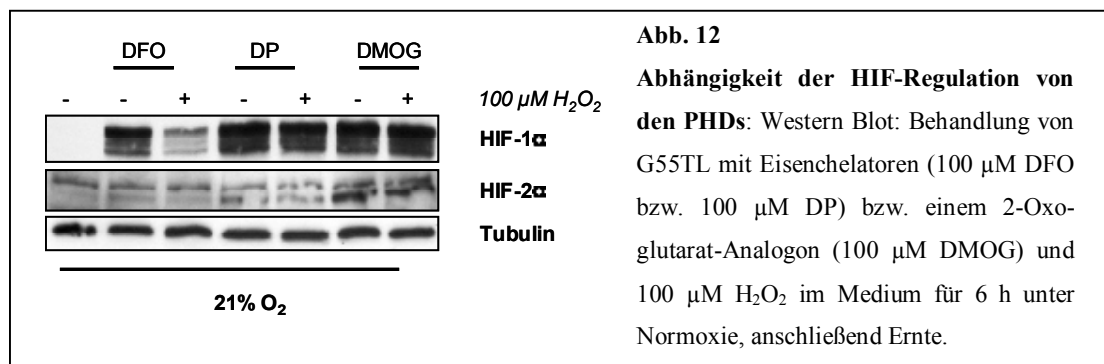
Außerdem sollte untersucht werden, ob dieser Mechanismus PHD-abhängig ist. Dazu wurden verschiedene HIF-Konstrukte generiert, mit denen die Zellen transient transfiziert wurden: Zum einen WT-HIF-1 α - und WT-HIF-2 α -Konstrukte, die V5-markiert sind, zum anderen zwei Mutanten. Bei einer der Mutanten sind die Prolylreste, an denen normalerweise die Hydroxylierung durch die PHDs stattfindet, zu Alanin mutiert, so dass sie einem PHD-vermittelten Abbau gegenüber resistent sind (HIF-1 α - Δ PP und HIF-2 α - Δ PP). Diese Konstrukte sind ebenfalls V5-markiert. Bei den anderen Mutanten sind neben diesen Prolylresten auch die Asparaginreste, an denen normalerweise FIH (*factor inhibiting HIF*) bindet, so verändert, dass keine Erkennung mehr erfolgen kann (HIF-1 α - Δ PPA und HIF-2 α - Δ PPA). Durch die V5-Markierung kann man in Abbildung 11 zwischen dem Anteil von endogenem und exogenem, transgenem HIF unterscheiden, da der V5-Antikörper nur den exogenen Anteil erkennt, der HIF-1 α -Antikörper jedoch beide. Die Zellen wurden nun mit diesen Konstrukten transient transfiziert und unter Normoxie und Hypoxie kultiviert. Als Kontrollen dienten mit pcDNA transfizierte Zellen. Abb. 11A zeigt, dass HIF durch eine



Inkubation unter Hypoxie induziert wird. Eine Mutation der Prolylreste führt zu einer Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α auch unter Normoxie. Eine zusätzliche Mutation der FIH-Bindungsstelle führt hier jedoch zu keiner weiteren Stabilisierung.

Um nun zu untersuchen, ob die HIF-Regulation durch ROS von einer Aktivität der PHDs abhängig ist, wurden Zellen transient mit den beschriebenen HIF- Δ PP-Konstrukten transfiziert und mit ROS behandelt. In Abb. 11B und C ist zu sehen, dass durch H₂O₂-Gabe eine Verminderung sowohl von Hypoxie-induziertem HIF (in der mit pcDNA transfizierten Kontrolle) als auch von überexprimiertem WT-HIF vermittelt wird. HIF- Δ PP dagegen wird nach H₂O₂-Gabe nicht degradiert. Betrachtet man nur das exogene HIF, das mit dem V5-Antikörper detektiert wurde, so ist besonders deutlich zu sehen, dass eine Mutation der Prolylreste zu einer Unempfindlichkeit gegenüber H₂O₂ führt. Dies gilt sowohl für HIF-1 α (Abb. 11B) als auch für HIF-2 α (Abb. 11C). Dieser Versuch zeigt, dass eine Hydroxylierung durch die PHDs eine Voraussetzung für den durch ROS induzierten HIF-Abbau ist und dieser Mechanismus somit über die Prolylhydroxylasen vermittelt zu werden scheint.

Um diese Abhängigkeit von den Prolylhydroxylasen weiter zu untersuchen, wurden die Enzyme in einem nächsten Versuch direkt inhibiert. Da die PHDs 2-Oxoglutarat als Kosubstrat benötigen, ist es möglich, sie durch Zugabe eines Analogons, Dimethyloxalylglycine (DMOG), zu inhibieren, so dass ein HIF-Abbau unter Normoxie verhindert wird. Es ist weiterhin bekannt, dass die Aktivität der PHDs beim Abbau von HIF eisenabhängig ist. Cheliert man Eisen im Zellkulturmedium, so kann ebenfalls durch Inhibition der PHDs auch unter normoxischen Bedingungen HIF induziert werden. Als Eisenchelatoren wurden Dipyridyl (DP) und Deferoxamine (DFO) verwendet. Die Zellen wurden unter Normoxie mit dem Inhibitor bzw. den Eisenchelatoren sowie H₂O₂ im



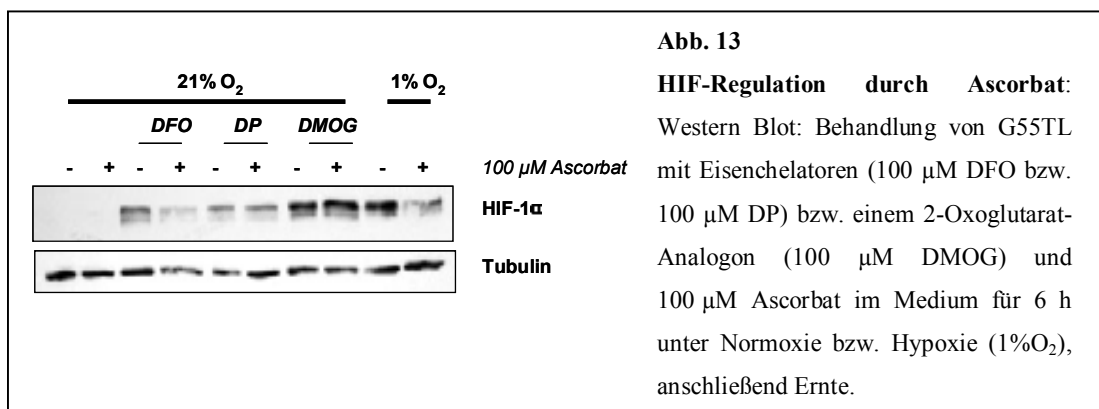
Medium inkubiert und anschließend mittels Western Blot analysiert. Abb. 12 zeigt, dass eine Zugabe des 2-Oxoglutarat-Analogons DMOG zu einer Induktion von HIF unter normoxischen Bedingungen führt. Diese Induktion zeigt keine Sensitivität gegenüber ROS, was ein weiteres Indiz für die Abhängigkeit des ROS-induzierten HIF-Abbaus von den PHDs ist. Des Weiteren ist in Abb. 12 zu erkennen, dass nach einer Zugabe der Eisenchelatoren DFO und DP HIF unter Normoxie nachweisbar ist. Hier ist zu sehen, dass DFO-induziertes HIF nach H_2O_2 -Zugabe abgebaut wird, DP-induziertes jedoch nicht. Auch niedrigere Konzentrationen von DP führten zu einer stabilen Induktion von HIF, die durch ROS-Behandlung nicht reduziert wurde (nicht gezeigt). Der Unterschied zwischen den Chelatoren liegt im Redox-Zustand des chelierten Eisens: DP cheliert zweiwertiges Eisen, DFO dagegen dreiwertiges Eisen (www.sigmaaldrich.com) – die unterschiedliche ROS-abhängige Sensitivität der HIF-Proteinmenge scheint also auf einen Unterschied im Redox-Zustand des vorliegenden Eisens zurückzuführen zu sein.

Der Redox-Zustand der Zellen ist ein wichtiger Faktor in der Regulation von Enzymen und anderen Molekülen und wird unter anderem durch die Aktivität reduzierender Enzyme wie der Superoxid-Dismutase oder der Glutathion-Peroxidase und der Anwesenheit von Reduktionsmitteln wie Ascorbat bestimmt.

3.5 Abhängigkeit der HIF-Regulation von Redox-Zustand der Zelle

3.5.1 Regulation von HIF durch Ascorbat

Es ist bekannt, dass Ascorbat die PHD-Aktivität reguliert – vermutlich über eine Erhöhung des Fe^{2+} -Gehaltes der Zelle (Knowles, Raval *et al.* 2003). Um den Einfluss des Redox-Zustandes der Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen deshalb mit Ascorbat behandelt. Untersucht wurde die Wirkung von Ascorbat unter Hypoxie sowie unter Normoxie auf durch PHD-Inhibition und Hypoxie induziertes HIF. In Abb. 13 ist zu sehen, dass wieder alle Behandlungen (Inkubation mit DFO, DP und DMOG sowie eine Inkubation unter Hypoxie) zu einer HIF-Induktion führen. Die Ascorbat-Gabe führt zu einer Destabilisierung von HIF unter Hypoxie, DFO-induziertes HIF wird ebenfalls durch Ascorbat abgebaut. DMOG- und DP-induziertes HIF wird analog zu den nach H_2O_2 -Behandlung beobachteten Effekten nicht abgebaut. Diese Versuche bestätigen, dass Ascorbat einen Einfluss auf die Regulation von HIF-Proteinmengen – vermutlich über eine direkte oder indirekte Aktivierung der PHDs – hat.



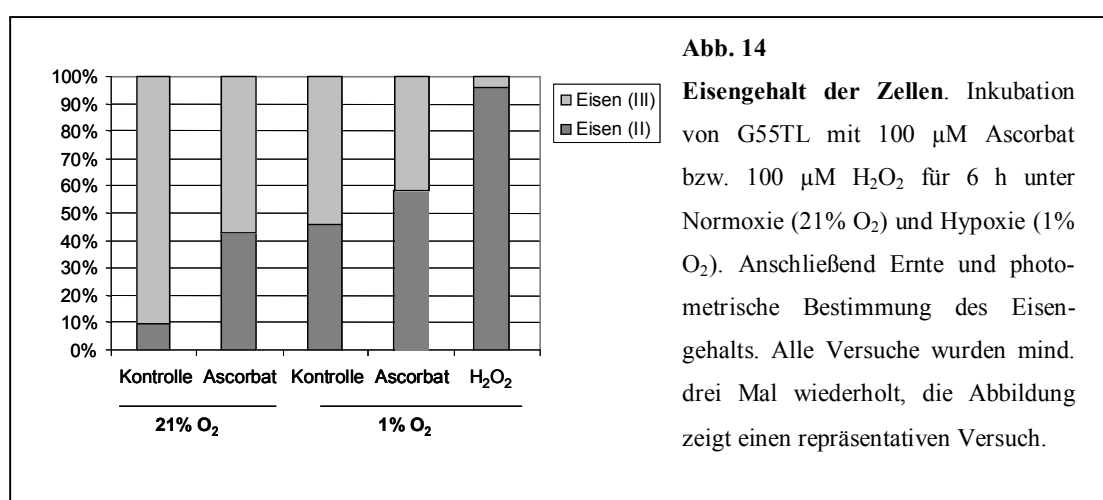
Überraschenderweise hat also die Behandlung mit dem Reduktionsmittel Ascorbat und eine Behandlung mit ROS, die oxidativ wirken, einen ähnlichen Effekt auf durch Hypoxie oder durch Zugabe von Eisenchelatoren induziertes HIF. Beide Substanzen beeinflussen vermutlich den Redox-Zustand des in der Zelle vorliegenden Eisens, das in zweiwertiger Form von den Prolylhydroxylasen als Kofaktor benötigt wird, jedoch in unterschiedlicher Weise. Die Sauerstoffradikale wirken vermutlich über einen weiteren (indirekten) Mechanismus, der trotz ihrer Eigenschaften als Oxidanzien zu einer Reduktion von Eisen führt.

3.5.2 Untersuchungen zum Eisengehalt der Zellen

Um diese These weiter zu untersuchen, wurde nun ein Versuchsaufbau etabliert, mit dem der Eisengehalt der Zellen und die Wertigkeit des vorliegenden Eisens untersucht werden konnte. Als Indikator wurde Natriumbathophenanthrolinsulfonat, ein chromogener Eisenchelator, verwendet, mit dessen Hilfe der intrazelluläre Eisengehalt photometrisch bestimmt werden konnte. Dazu wurden die Zellen unter Normoxie bzw. Hypoxie mit 100 μ M H₂O₂ oder 100 μ M Ascorbat behandelt, anschließend geerntet, die Ansätze halbiert und die Zellen unter Zugabe von Salzsäure aufgebrochen. Dann wurde in jeweils einem Aliquot pro Ansatz das gesamte vorhandene Eisen durch die Zugabe von hochkonzentriertem Ascorbat zu Fe²⁺ reduziert, so dass in dieser Probe der Gesamteisengehalt bestimmt werden konnte. Aus der Differenz zwischen dem Gehalt an Fe²⁺ und dem Gesamteisengehalt konnte so auch der Gehalt an Fe³⁺ in den Zellen bestimmt werden.

Abbildung 14 zeigt, dass unter normoxischen Bedingungen etwa 10% des in der Zelle vorhandenen Eisens in der reduzierten Form vorliegt. Wie zu erwarten führt eine

Behandlung mit dem Reduktionsmittel Ascorbat zu einer Zunahme an zweiwertigem Eisen in den Zellen. Unter Hypoxie, also reduzierenden Bedingungen, inkubierte Zellen enthalten ebenfalls einen höheren Anteil zweiwertigen Eisens als unter Normoxie inkubierte (etwa 40%). Auch hier führte eine Behandlung mit Ascorbat zu einer weiteren Zunahme an zweiwertigem Eisen auf über 50%. In Übereinstimmung mit der Hypothese, dass es einen ROS-vermittelten eisenreduzierenden Effekt gibt, führte auch die Behandlung mit H_2O_2 unter Hypoxie zu einer starken Zunahme an zweiwertigem Eisen. Hier lag über 90% des Eisens in reduzierter Form vor.



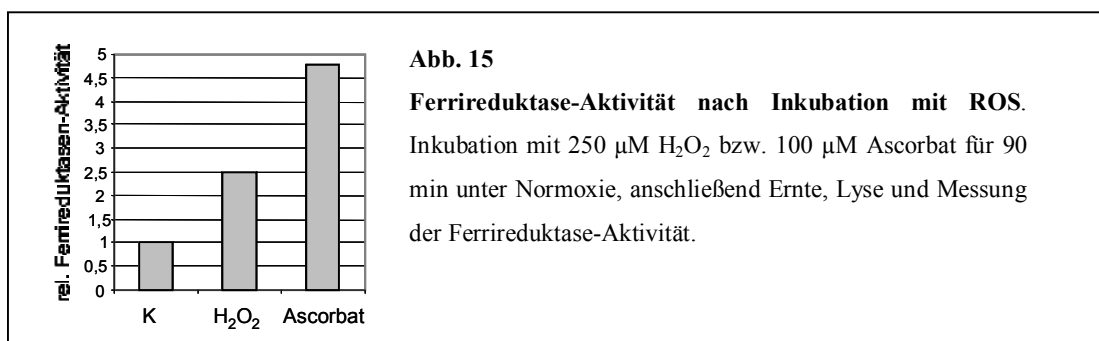
Die Zugabe von Ascorbat und überraschenderweise auch von H_2O_2 führt somit zu einer Erhöhung des intrazellulären Fe^{2+} -Gehaltes.

3.6 Die Ferrireduktasen als Kandidaten zur Regulation der Prolylhydroxylasen

3.6.1 Identifizierung der Ferrireduktasen mittels Datenbankrecherche

Bei der Suche nach einem Zusammenhang zwischen der Wertigkeit des in der Zelle vorliegenden Eisens, des chelierten Eisens, dem Redox-Zustand der Zelle und ROS-Gabe in Bezug auf die beobachtete Sensibilität von HIF sind wir bei einer Datenbankrecherche auf die Familie der Ferrireduktasen gestoßen. Die zugrunde liegende Idee dabei war, dass es einen Modulator für den beobachteten Effekt geben muss: Die Zugabe von exogenen ROS, die eine oxidierende Wirkung haben, führte zu einer Zunahme an zweiwertigem Eisen in der Zelle, das heißt zu einer Reduktion. Da dies nicht durch eine direkte Wirkung zu erklären ist, könnte eine enzymatische Reaktion zugrunde liegen, die durch ROS aktiviert wird und zur Reduktion von Eisen führt.

Um diese Hypothese einer Induzierbarkeit von eisenreduzierenden Enzymen durch ROS zu untersuchen, wurde ein Ferrireduktase-Assay zur Messung der Enzymaktivität nach einer Behandlung mit H_2O_2 und Ascorbat nach Ohgami, Campagna *et al.* (2005) in leicht modifizierter Form durchgeführt. Um zu vermeiden, dass nach einer Behandlung mit H_2O_2 oder Ascorbat der gemessene Fe^{2+} -Anteil aus einer direkten Modifikation des in den Zellen vorhandenen Eisens resultiert, wurden die Zellen nach der Behandlung mehrmals gewaschen, geerntet und anschließend vor der Bestimmung der Enzymaktivität lysiert (siehe 2.7.10). So konnte die Aktivität der Enzyme im Zelllysate bestimmt werden. Abb. 15 zeigt die Ergebnisse des Ferrireduktase-Assays nach einer Behandlung mit ROS: Eine Zugabe von exogenen Sauerstoffradikalen führt zu einer Zunahme der Ferrireduktase-Aktivität auf das 2,5fache. Eine noch deutlichere Erhöhung wird durch die Zugabe von Ascorbat induziert.

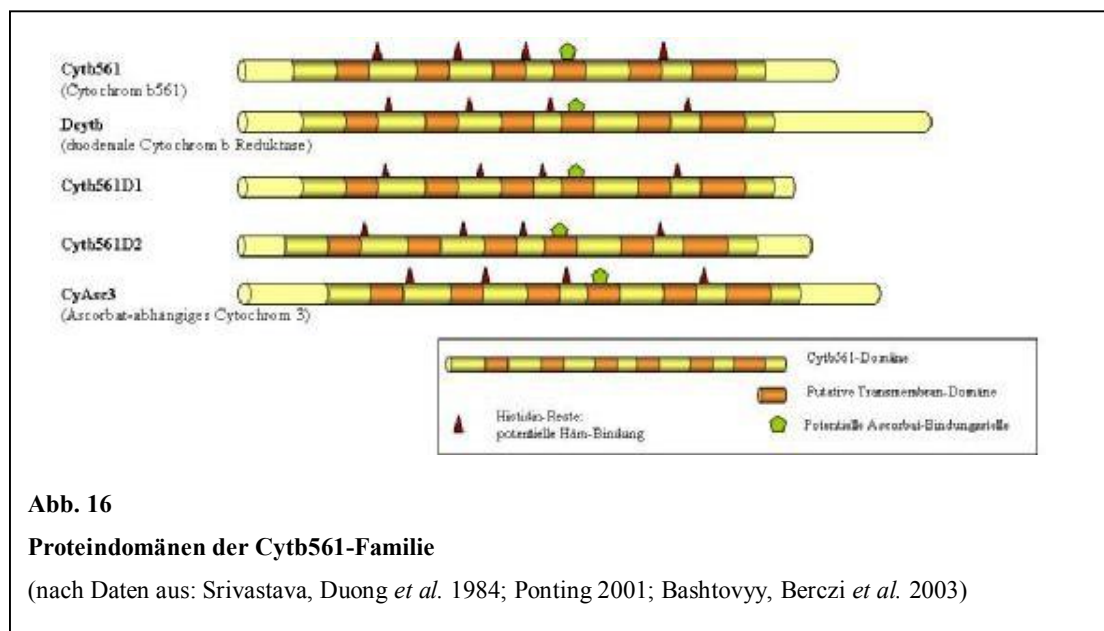


Eine Zugabe von ROS scheint also tatsächlich eine enzymvermittelte eisenreduzierende Aktivität zu induzieren. Darüber hinaus wird auch durch Zugabe von Ascorbat zum Zellkulturmedium eine Enzymaktivität induziert, die in Abwesenheit der Substanz ebenfalls noch messbar ist. Das vermittelnde Enzym müsste also reduzierende Aktivität sowie eine Aktivierbarkeit durch Sauerstoffradikale zeigen.

Die Proteinfamilie der Ferrireduktasen könnte diese Eigenschaften haben. Die Enzyme dieser Familie haben eine Homologie zu Cytochrom b561 (Cytb561), einem Transmembranprotein. Cytb561 findet sich hauptsächlich in der Membran von Katecholamin-sezernierenden Vesikeln in der Hypophyse und der Nebenniere sowie anderen neuroendokrinen Geweben (Flatmark und Terland 1971). Das Enzym transportiert Reduktionsäquivalente über die Membran, welche für die Regeneration von Ascorbat notwendig sind (Srivastava 1995). Als Ferrireduktasen wurde die Familie erstmals nach der Identifizierung des Cytb561-Homologs Dcytb (duodenale Cytochrom *b* Reduktase) bezeichnet, das im Duodenum die Reduktion von schwer löslichem dreiwertigem Eisen zu zweiwertigem Eisen katalysiert (McKie, Barrow *et al.* 2001). Neben diesen beiden Proteinen gibt es noch drei weitere humane Homologe, die alle die konservierte cytb561-Domäne aufweisen: *Cytochrome b-561 domain containing 1* (Cytb561D1), *Cytochrome b-561 domain containing 2* (Cytb561D2) und das Ascorbat-abhängige Cytochrom 3 (CyAsc3) (www.ensembl.org; Tsubaki, Takeuchi *et al.* 2005). Eine weitere Datenbank-Recherche ergab folgende Eigenschaften für die Homologe:

- **Cytb561**: Ferrireduktase-Aktivität nachgewiesen (Vargas, Herpers *et al.* 2003)
- **Dcytb1**: duodenale Cytochrom *b* Reduktase 1; durch Hypoxie und Eisenmangel reguliert (Latunde-Dada, Van der Westhuizen *et al.* 2002); Expression in verschiedenen Organen (unter anderem im Gehirn (McKie, Latunde-Dada *et al.* 2002) und im Lungenepithel (Turi, Wang *et al.* 2006)); Ferrireduktase-Aktivität nachgewiesen (McKie, Barrow *et al.* 2001)
- **Cytb561D1**: bisher nicht beschrieben
- **Cytb561D2**: putativer Tumorsuppressor (Lerman und Minna 2000) bisher ist nur das Maushomolog 101F6 beschrieben (Chow, Lo *et al.* 2004)
- **CyAsc3**: Ascorbat-abhängiges Cytochrom 3; bisher nicht beschrieben

Die konservierte cytb561-Domäne besteht aus sechs putativen Transmembrandomänen mit vier Histidinresten, die potentielle Liganden für zwei Hämgruppen darstellen. Auch die Bindungsstellen für Ascorbat und Semidehydroascorbat sind teilweise konserviert (Bashtovyy, Berczi *et al.* 2003). Die Bindung von Ascorbat als Reduktionsäquivalent ist dabei gewebespezifisch und konnte beispielsweise nur für das im Duodenum nachgewiesene Dcytb gezeigt werden, im Lungenepithel dagegen nicht (Turi, Wang *et al.* 2006).



Die Familie weist keine signifikante Homologie zu anderen beschriebenen Ferrireduktasen in Hefe oder Pflanzen auf. In Mäusen und *Drosophila* ist ein verwandtes Protein, *sdr2*, das ebenfalls als Ferrireduktase beschrieben wurde, bekannt (Shirozu, Tada *et al.* 1996; Ponting 2001). Kürzlich wurde daneben eine weitere Ferrireduktase identifiziert, *steap3*, die die Aufnahme von Transferrin-gebundenem Eisen vermittelt. *Steap3* gehört nicht zur cytb561-Familie und ist ein NADPH-abhängiges Enzym mit nur einer Hämbindungsstelle (Ohgami, Campagna *et al.* 2005).

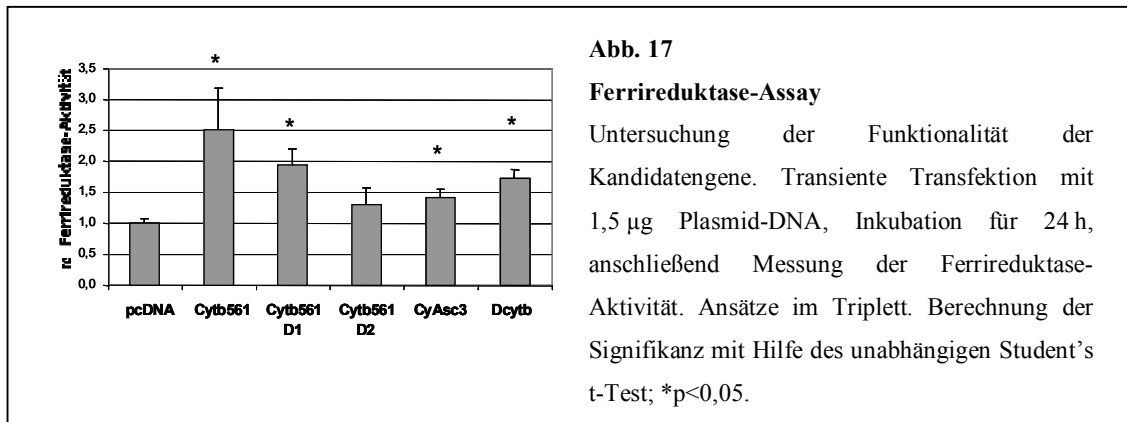
Die beschriebenen Eigenschaften machen die Ferrireduktasen (FR) zu interessanten Kandidaten für weitere Untersuchungen, denn ein Enzymsystem, das in Abhängigkeit von Ascorbat oxidiertes dreiwertiges Eisen zu zweiwertigem Eisen reduziert, würde eine Erklärung für die vergleichbare Wirkung von ROS und Ascorbat auf den Redox-Zustand des Eisens liefern. Durch eine erhöhte Aktivität der Ferrireduktasen nach der Bildung oder exogenen Zugabe von ROS läge vermehrt Fe^{2+} in den Zellen vor, wodurch die Aktivität

der PHDs erhöht und HIF in verstärktem Maße abgebaut würde.

3.6.2 Klonierung der Kandidatengene

Um die potentielle Rolle dieser Kandidaten zu untersuchen, wurden die genannten Gene aus cDNA bzw. aus über das RZPD bezogenen IMAGE-Klonen kloniert. Dazu wurden die aus der Datenbank bekannten Sequenzen mittels geeigneter Primer aus den Plasmiden bzw. aus mittels reverser Transkription aus Zellen gewonnener cDNA amplifiziert. Anschließend wurden die gewonnenen Amplifikate mit Hilfe des Directional TOPO® Expression Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) V5-markiert und in den pcDNA3.1-Vektor kloniert. Dabei wurde auch eine Kozak-Sequenz zum Translationsstart in die Expressionsplasmide inseriert (Kozak 1987). Die Sequenzen der so gewonnenen Plasmide wurden mittels Sequenzierung überprüft.

Die Expression der klonierten Gene wurde mittels *in-vitro*-Transkription und -Translation überprüft. Die dabei synthetisierten Proteine wurden über ein 12%iges denaturierendes Acrylamidgel aufgetrennt und mittels Western Blot über eine Bindung des V5-Antikörpers detektiert (nicht gezeigt). Um zu untersuchen, ob eine Expression der putativen Ferri-reduktasen zu einer Reduktion von Eisen in den untersuchten Glioblastomzellen führt, wurde ein Ferrireduktase-Assay modifiziert nach Ohgami (2005) durchgeführt. Bisher war eine eisenreduzierende Aktivität nur für Dcytb (McKie, Barrow *et al.* 2001) und Cytb561 (Vargas, Herpers *et al.* 2003) nachgewiesen worden. Für den Assay wurden die Zellen mit den verschiedenen Konstrukten transient transfiziert. Als Kontrolle dienten mit pcDNA transfizierte Zellen. Am folgenden Tag wurden die transfizierten Zellen mit Fe^{3+} -NTA und Ferrozin als chromogenem Eisenchelator inkubiert. Die Bildung von Fe^{2+} wurde photometrisch bestimmt. Abb. 17 zeigt, dass eine Überexpression der putativen Ferrireduktasen in allen Fällen zu einer erhöhten Fe^{2+} -Produktion führte. Diese Erhöhung war mit Ausnahme der mit Cytb561D2 transfizierten Zellen für alle Konstrukte signifikant im Vergleich zu den mit pcDNA transfizierten Zellen ($p < 0,05$). Damit ist gezeigt, dass die Expression der identifizierten Kandidaten tatsächlich eine eisenreduzierende Aktivität in Glioblastomzellen induziert.



3.6.3 Expression der Ferrireduktasen

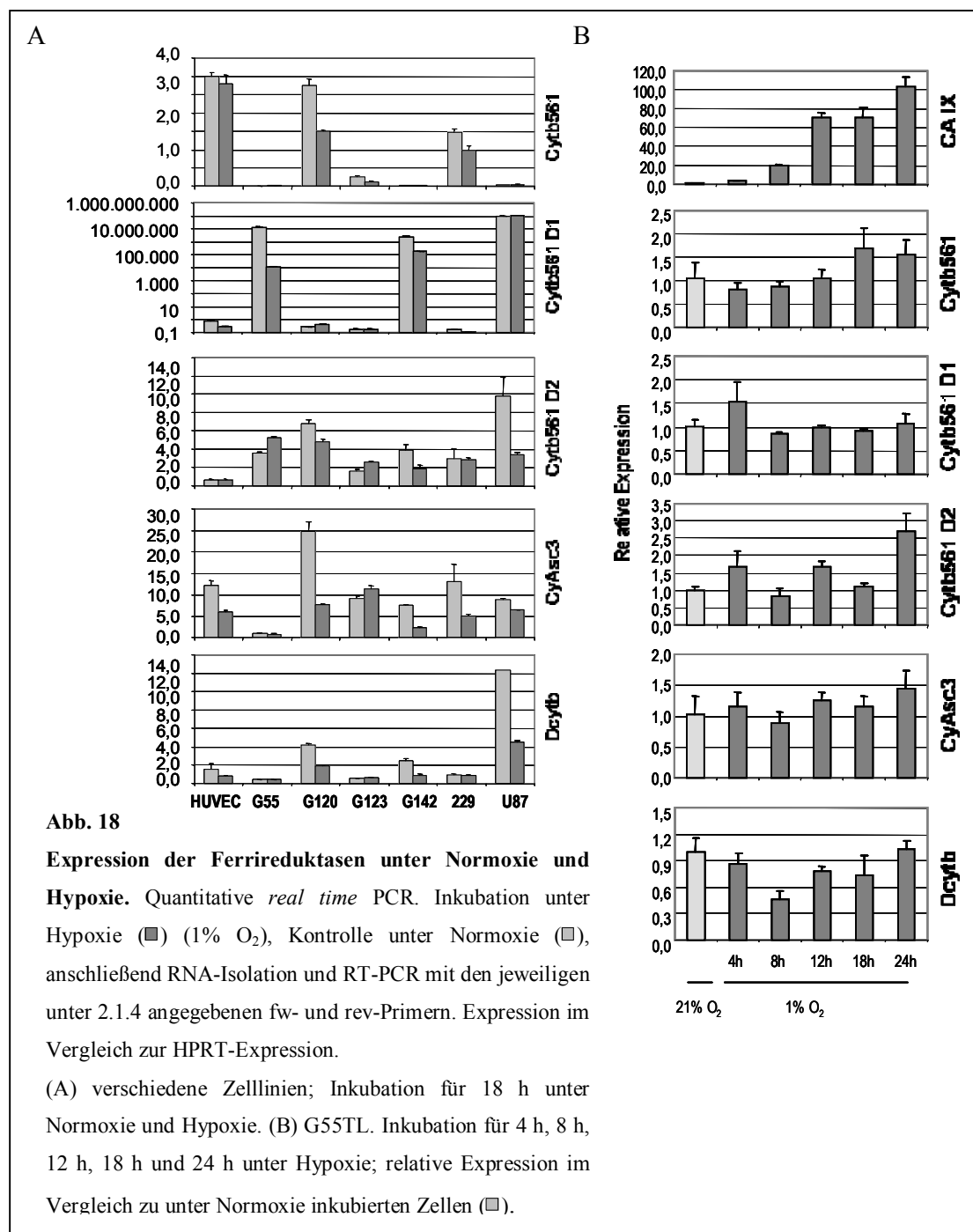
Regulation durch Normoxie und Hypoxie

In der Literatur ist für Dcytb in duodenalen Villi eine Hypoxie-Regulation beschrieben (Latunde-Dada, Van der Westhuizen *et al.* 2002). Um die endogene Expression der Ferrireduktasen in Glioblastomzellen zu untersuchen, wurde von mehreren Glioblastomlinien sowie von HUVEC-Zellen (*human umbilical vein endothelial cells*, primäre Endothelzellen aus der Nabelschnur) nach Inkubation für 18 h unter Normoxie bzw. Hypoxie RNA isoliert, in cDNA transkribiert und eine quantitative *real time* PCR durchgeführt. So konnte die Expression der einzelnen Gene im Vergleich zur Expressionshöhe des Haushaltsgens HPRT bestimmt werden.

Eine Analyse der Expression aller Kandidaten unter Normoxie und Hypoxie zeigte sehr große zellspezifische Unterschiede. So unterscheidet sich insbesondere die Expressionshöhe von Cytb561D1 zwischen den untersuchten Zelllinien um bis zu sechs log-Stufen: In den Zelllinien G55TL, G142 und U87 ist das Gen sehr hoch exprimiert (Abb. 18A: logarithmische Achsenskalierung für Cytb561D1; alle übrigen Diagramme normale Skalierung), in HUVEC und den übrigen untersuchten Glioblastom-Zelllinien ist die Expression dagegen deutlich niedriger. Cytb561 ist im Gegensatz dazu in eben diesen Zelllinien mit niedriger Cytb561D1-Expression vergleichsweise hoch exprimiert (HUVEC, G120, 229), so dass es sich um eine alternative Expression der beiden Ferrireduktasen handeln könnte. Cytb561D2 ist in allen untersuchten Zelllinien exprimiert, besonders hoch in U87-Zellen unter Normoxie. CyAsc3 ist ebenfalls in allen untersuchten Zelllinien in vergleichbarem Niveau nachweisbar, in G120-Zellen ist darüber hinaus eine

Hochregulation unter Normoxie zu erkennen. In U87-Zellen ist neben der erwähnten Cytb561D1- und Cytb561D2-Expression auch eine vergleichsweise hohe Expression von Dcytb zu sehen.

Insgesamt sieht man keine eindeutige Regulation durch Hypoxie, sondern eher eine sehr zellspezifische Regulation.



So wird Cytb561 beispielsweise in G55TL-Zellen durch Hypoxie induziert (4fach), in G120, G123 und 229 wird dieses Gen dagegen reprimiert. Cytb561 unterliegt dagegen in G55TL (und G142) einer Hypoxie-induzierten Repression, in den anderen untersuchten Zelllinien hat der Sauerstoffgehalt weniger Einfluss auf die Expressionshöhe. Die Expression von Cytb561D2 wird in den meisten der untersuchten Zelllinien durch Hypoxie wenig beeinflusst oder reprimiert (U87). Ein ähnliches Bild zeigte sich für Dcytb, das in U87 unter Hypoxie sogar sehr deutlich niedriger exprimiert ist. CyAsc3 wird durch 18stündige Hypoxie-Behandlung in zwei Zelllinien (G55TL, G123) induziert, in den fünf anderen untersuchten dagegen reprimiert.

Um zu untersuchen, ob die Regulation durch kürzere oder längere Inkubation unter Hypoxie beeinflusst wird, wurden exemplarisch zwei Zelllinien, G55TL und G141, für verschiedene Zeitspannen unter Hypoxie inkubiert. Dazu wurde nach 4 h, 8 h, 12 h, 18 h und 24 h Hypoxie sowie von unter Normoxie inkubierten Zellen RNA isoliert und wieder eine quantitative *real time* PCR durchgeführt. Abb. 18B zeigt, dass die mRNA-Expression von drei der fünf untersuchten Ferrireduktasen in G55TL im Vergleich zur Normoxie durch Hypoxie leicht induziert wird, diese Regulation aber nur transient zu sein scheint: Cytb561 und Cytb561D2 werden nach einer Hypoxie-Inkubation für 18 h bzw. 24 h induziert, Cytb561D1 dagegen nur nach einer kürzeren Inkubation unter Hypoxie. Cytb561D2 und Dcytb werden darüber hinaus nach 8 bzw. 18 h Inkubation unter Hypoxie geringer exprimiert als unter Normoxie. Als Kontrolle für eine Hypoxie-Induktion von Genen im Allgemeinen wurde hier die Expression von CA IX untersucht. Wie Abb. 18B oben zeigt, wurde dieses Gen durch eine Inkubation unter Hypoxie zeitabhängig induziert. Auch in der Glioblastom-Linie G141 war zu keinem untersuchten Zeitpunkt eine starke Regulation zu erkennen (nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Regulation der Ferrireduktasen auf transkriptioneller Ebene stark zellspezifisch ist. Die Expressionshöhen unterscheiden sich sehr stark zwischen den einzelnen Zelllinien. Insbesondere Cytb561 und Cytb561D1 scheinen alternativ exprimiert zu werden. Eine Inkubation unter Hypoxie führt in einigen Zelllinien zu einer Repression einzelner Ferrireduktasen. Darüber hinaus ist eine zeitabhängige Regulation unter Hypoxie zu beobachten.

Lokalisation der Ferrireduktasen

Zur weiteren Charakterisierung der Ferrireduktasen wurde ihre zelluläre Lokalisation mittels immunhistochemischem Nachweis untersucht. Dazu wurden die Ferrireduktasen-Kandidaten transient wie unter 2.8.3 beschrieben in G55TL-Zellen transfiziert. Als Kontrolle dienten mit pcDNA transfizierte Zellen. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Methanol fixiert und die Konstrukte anhand ihrer V5-Markierung mit dem entsprechenden Antikörper detektiert.

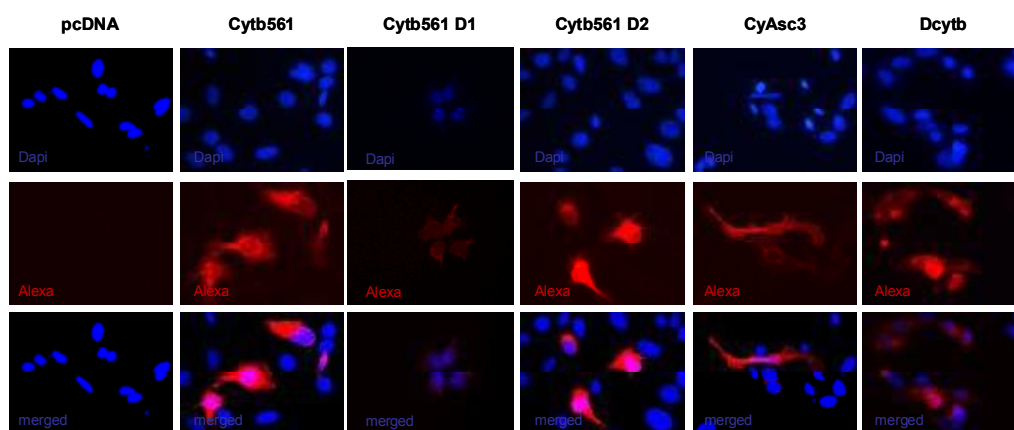


Abb. 19

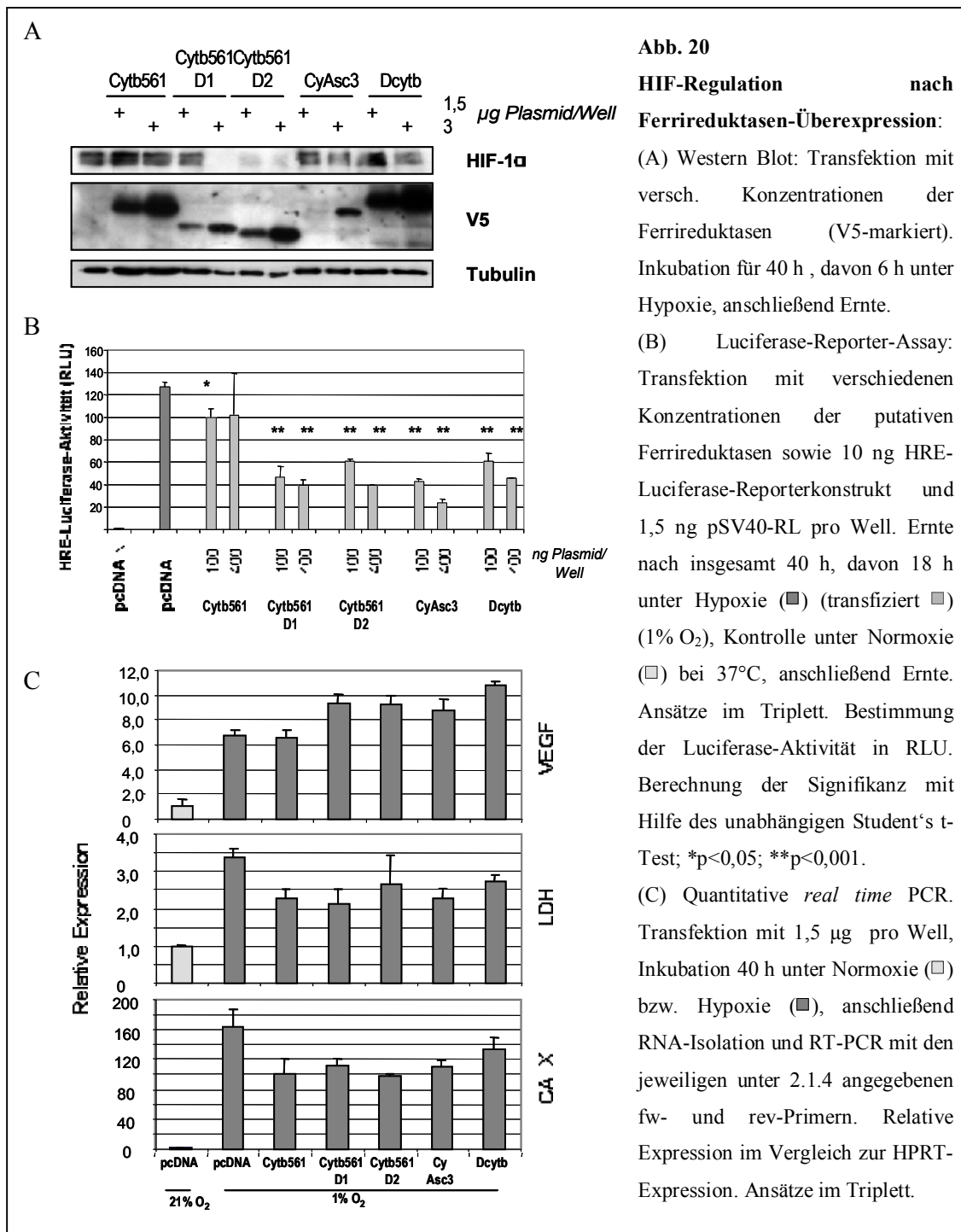
Lokalisation der FR nach Überexpression. Transiente Transfektion der G55TL-Zellen mit V5-markierten Ferrireduktase-Konstrukten, immunhistochemische Färbung mit Antikörper gegen V5 und DAPI-Kernfärbung (40fache Vergrößerung).

Abb. 19 zeigt die Lokalisation der Ferrireduktasen im Fluoreszenzmikroskop in den untersuchten Zellen nach Behandlung mit einem V5-Antikörper sowie einem Alexa-568-markierten Sekundärantikörper. In rot sind dabei die Ferrireduktasen angefärbt, in blau die Zellkerne mit DAPI. Es ist zu sehen, dass Cytb561, Cytb561D2 und CyAsc3 hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert sind. Cytb561D1 ist ebenfalls im Zytoplasma detektierbar, jedoch mit einer perinukleären Akzentuierung. Dcytb ist, wie auch in der Literatur beschrieben, sowohl zytoplasmatisch als auch in der Membran detektierbar (McKie, Barrow *et al.* 2001). In der Kontrolle, den mit dem pcDNA-Vektor transfizierten Zellen, ist keine Alexa-586-Färbung zu erkennen.

3.6.4 Einfluss der Ferrireduktasen auf HIF und HIF-Targetgene

Um zu untersuchen, ob die Ferrireduktasen tatsächlich einen Einfluss auf die Stabilität von HIF haben, wurde mittels Western Blot der Effekt einer Überexpression der putativen Ferrireduktasen untersucht. Dazu wurden zwei verschiedene DNA-Konzentrationen der Kandidatengene transient in G55TL-Zellen transfiziert, am folgenden Tag wurden die Zellen für 6 h unter Hypoxie inkubiert und anschließend geerntet. In Abb. 20A ist zu sehen, dass eine Überexpression der untersuchten Gene zum Teil zu einer Minderung der Hypoxie-induzierten HIF-Expression führt: Eine Überexpression von Cytb561D1 führt zu einer dosisabhängigen Destabilisierung von HIF. Die Überexpression von Cytb561D2 führt ebenfalls zu einer Verringerung der HIF-Proteinmenge. Auch die Transfektion mit CyAsc3 sowie Dcytb führt zu einem leichten Abbau des Proteins. Eine Überexpression von Cytb561 dagegen hat keinen sichtbaren Effekt auf die Stabilität von HIF. Mit Hilfe des Antikörpers gegen die V5-Markierung der Plasmide konnte außerdem die Expressionshöhe der einzelnen Transgene untersucht werden. So war insbesondere die gebildete Proteinmenge von Cytb561 (27,6 kDa) und Dcytb (31,6 kDa) sehr hoch, Cytb561D1 (25,4 kDa) und Cytb561D2 (23,9 kDa) wurden deutlich geringer exprimiert, und CyAsc3 (26,5 kDa) war nur in der höheren der transfizierten Konzentrationen nachweisbar.

Um den Effekt der Ferrireduktasen-Überexpression genauer zu untersuchen, wurde außerdem ein Luciferase-Reporter-Assay durchgeführt. Dazu wurden die Zellen transient mit den Ferrireduktasen sowie dem HRE-Luciferase-Reporter und einem Renilla-Luciferase-Konstrukt zur internen Kontrolle transfiziert. Als Kontrollen dienten mit pcDNA transfizierte Zellen, die unter Normoxie bzw. Hypoxie kultiviert wurden. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 18 h unter hypoxischen Bedingungen inkubiert und der Effekt der Überexpression auf die Aktivität des durch HIF aktivierten Reporters untersucht. Abb. 20B zeigt, dass auch hier eine Überexpression der Gene Cytb561D1 und Cytb561D2 sowie CyAsc3 zu einer Reduktion auf unter 30% des Kontrollwertes der HRE-Reporter-Aktivität führte. In diesem Versuch war auch eine Reduktion der Reporteraktivität um ungefähr 50% bzw. 60% nach Überexpression von Dcytb in verschiedenen Konzentrationen zu erkennen. Eine Überexpression von Cytb561 zeigte hier dagegen einen deutlich geringeren Effekt.



Um nicht nur die unmittelbaren Effekte der Kandidatengene auf HIF, sondern auch den Effekt auf HIF-Targetgene zu untersuchen, wurde eine quantitative *real time* PCR durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen nach einer transienten Transfektion mit den Plasmiden am folgenden Tag für 18 h unter Hypoxie inkubiert, nach insgesamt 48 h wurde RNA isoliert und diese in cDNA transkribiert. Dann wurde die relative Expressionshöhe von HIF-Targetgenen relativ zur Expression des Haushaltsgens HPRT bestimmt. Als

Kontrollen dienten wieder mit pcDNA transfizierte Zellen, die unter Normoxie bzw. Hypoxie kultiviert worden waren. Abb. 20C zeigt, dass eine Kultivierung unter Hypoxie in den mit dem Kontrollvektor pcDNA transfizierten Zellen zu einer Induktion der HIF-Targetgene VEGF, LDH und CA IX führt. Eine Überexpression der Ferrireduktasen führte zu einer Verringerung der Induktionshöhe. Dies ist insbesondere sehr deutlich bei dem stark Hypoxie-regulierten Gen CA IX zu sehen. Auch LDH wird durch die Überexpression aller untersuchten Kandidatengene außer Cytb561D2 signifikant verringert. Die Expression des HIF-Targetgens VEGF dagegen wird durch die Überexpression von Cytb561D1, Cytb561D2, CyAsc3 und Dcytb signifikant erhöht. Diese von den anderen HIF-Targetgenen unterschiedliche Regulation ist ein Effekt, der auch schon bei der Untersuchung des Einflusses von H₂O₂ aufgefallen war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Überexpression aller untersuchten Ferrireduktasen zu einem mehr oder weniger starken Abbau von HIF bzw. einer Reduktion der HIF-Aktivität führt. Insbesondere Cytb561D1 und Cytb561D2 scheinen einen deutlichen Einfluss auf die Stabilität des Proteins zu haben. Diese Daten sind im Einklang mit der Hypothese, dass durch eine verstärkte Ferrireduktasen-Aktivität mehr zweiwertiges Eisen in der Zelle vorliegt, was die Prolylhydroxylasen aktivieren und somit HIF destabilisieren kann.

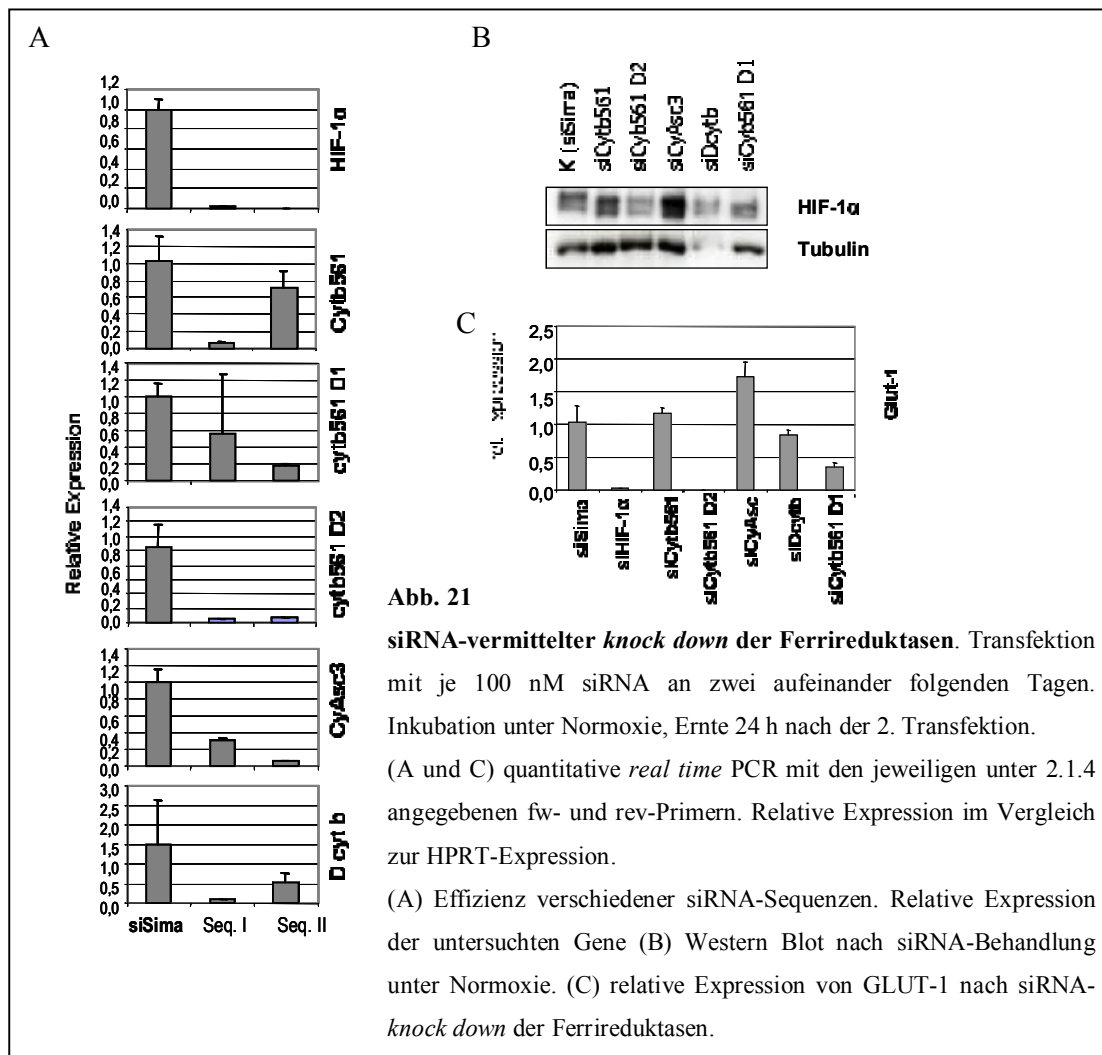
3.6.5 siRNA-vermittelter *Knock down* der Ferrireduktasen

Eine Überexpression der Ferrireduktasen führte zu einer Verminderung der HIF-Proteinmenge und somit auch der HIF-Aktivität. Zu erwarten wäre, dass im Gegenzug eine Inhibition der Ferrireduktasen zu einer Stabilisierung von HIF durch eine Verminderung der PHD-Aktivität führt, da diese zweiwertiges Eisen benötigen.

Um die Rolle der Ferrireduktasen bei der PHD-vermittelten Regulation von HIF weiter zu untersuchen, wurden im nächsten Schritt „*loss of function*“-Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde die Technik des siRNA-vermittelten *knock downs* etabliert. Für diese Versuche wurden kurze, doppelsträngige RNAs mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden, so genannte siRNAs ("*small interfering RNAs*") hergestellt und in die Zellen eingebracht. Die siRNAs fungieren dort als Leitmotiv für eine Nuklease, was zum Abbau der komplementären mRNA-Sequenz des Zielgens führt, so dass die Proteintranslation unterbleibt (Elbashir, Harborth *et al.* 2001).

Für jedes untersuchte Gen sowie für HIF-1 α als Kontrolle wurden zunächst verschiedene Sequenzen auf ihre *knock-down*-Effizienz hin getestet. Dazu wurden die Zellen wie unter 2.8.4 beschrieben an zwei aufeinander folgenden Tagen mit jeweils 100 nM der entsprechenden siRNA transfiziert und am darauf folgenden Tag RNA isoliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einer siRNA-Sequenz gegen *Sima*, das Drosophila-Homolog von HIF transfiziert worden waren. Die verwendete si*Sima*-Sequenz zeigt keine Homologien zur humanen HIF-Sequenz. Abb. 21A zeigt die relative Expressionshöhe der untersuchten Gene nach einer siRNA-Behandlung jeweils im Vergleich zu mit si*Sima* transfizierten Zellen. Die Effizienz des *knock downs* ist unterschiedlich hoch, und so wurde für jedes Gen die Sequenz mit dem stärkeren Effekt für weitere Versuche ausgewählt: Für HIF-1 α die Sequenz II, für Cytb561 Sequenz I, für Cytb561D1 Sequenz II, für Cytb561D2 Sequenz I, für CyAsc3 Sequenz II und für Dcytb Sequenz I. Alle ausgewählten Sequenzen führten zu einer Reduktion in der Genexpression um mindestens 70%. Im Folgenden wurde nun der Effekt eines siRNA-vermittelten *knock downs* der Ferrireduktasen auf die Expression von HIF und HIF-Targetgenen untersucht.

Um die Rolle der Ferrireduktasen weiter zu analysieren, wurde der Effekt eines *knock downs* mittels der ausgewählten siRNA-Sequenzen auf die HIF-Expression im Western Blot untersucht. Dazu wurden die Zellen wie beschrieben an zwei Tagen transfiziert und anschließend die HIF-Proteinmenge durch Western Blot-Analysen bestimmt. Des Weiteren wurde auch der Einfluss eines *knock downs* auf die Expression des HIF-Targetgens GLUT-1 mittels quantitativer *real time* PCR untersucht. Abb. 21B zeigt, dass eine Inhibition der Ferrireduktasen-Expression unterschiedliche Auswirkungen auf die HIF-Proteinmenge hat: Ein *knock down* von Cytb561 führte zu einer leichten Erhöhung der HIF-Menge unter Normoxie, ein *knock down* von CyAsc3 zu einer deutlichen Stabilisierung von HIF-Protein. Der *knock down* von Cytb561D1, Cytb561D2 und Dcytb dagegen brachte einen Abbau von HIF im Vergleich zur mit si*Sima* transfizierten Kontrolle mit sich.



Die Analyse der HIF-Targetgen-Expression in Abb. 21C bestätigt diese Daten: Der *knock down* von Cytb561 hat keinen Effekt auf die Expressionshöhe von GLUT-1. Der *knock down* von Cytb561D2, der zu einem Abbau von HIF-Protein führte, führt auch zu einer kompletten Repression der HIF-Targetgen-Expression. Auch der *knock down* der beiden anderen Gene, der eine Verringerung der Proteinmenge mit sich brachte, Cytb561D1 und Dcytb, führt zu einer Reduktion in der GLUT-1-Expression. Die in Abb. 21B beobachtete Hochregulation von HIF nach einer Inhibition von CyAsc3 zeigt sich ebenfalls auch in Abb. 21C wieder – die Expression von GLUT-1 steigt auf die 1,7fache Höhe des mit siSima behandelten Normoxiewertes.

Auch ein *knock down* mit anschließender Inkubation unter Hypoxie zeigte vergleichbare Effekte (Abb. 22A): Insbesondere nach einer Inhibition von CyAsc3 und Cytb561 ist eine weitere Erhöhung der Proteinmenge zu erkennen. Der *knock down* von Cytb561D2 führt

ebenfalls zu einer Stabilisierung von HIF im Vergleich zur mit *siSima* transfizierten Kontrolle. *siCytb561D1* und *siDcytb* dagegen hatten hier kaum einen Effekt.

Unter normoxischen Bedingungen scheinen somit vor allem Cytb561 und CyAsc3 einen Einfluss auf die Stabilität von HIF zu haben. Unter Hypoxie spielt neben diesen beiden Enzymen auch Cytb561D2 eine Rolle – eine Überexpression führt zu einer Reduktion in der HIF-Proteinmenge, ein *knock down* dagegen zu einer Erhöhung.

Diese Befunde legen nahe, dass diese Mitglieder der Familie der Ferrireduktasen (Cytb561, Cytb561D2 und CyAsc3) eine essentielle Rolle in der Regulation der HIF-Expression unter Normoxie und Hypoxie innehaben.

3.6.6 Regulation der Ferrireduktasen durch ROS

Die Ferrireduktasen könnten das Enzymsystem sein, dass das ROS-Signal über eine vermehrte Reduktion von Eisen und damit eine Aktivierung der PHDs an HIF weiterleitet. Um diese Aktivierung des Enzymsystems zu untersuchen, wurden Zellen nach einer Transfektion mit siRNA mit H_2O_2 behandelt. Sollten die Ferrireduktasen der Modulator der ROS-induzierten HIF-Reduzierung sein, so sollte nach einem *knock down* der Enzyme eine ROS-Behandlung ohne regulatorischen Effekt auf HIF bleiben. Um dies zu untersuchen, wurden die Zellen nach dem beschriebenen Protokoll mit siRNA transfiziert. Am Tag nach der zweiten Transfektion wurden die Zellen mit 250 μM H_2O_2 im Zellkulturmedium behandelt und für 6 h unter Hypoxie inkubiert. Als Kontrolle dienten wieder mit *siSima* transfizierte Zellen.

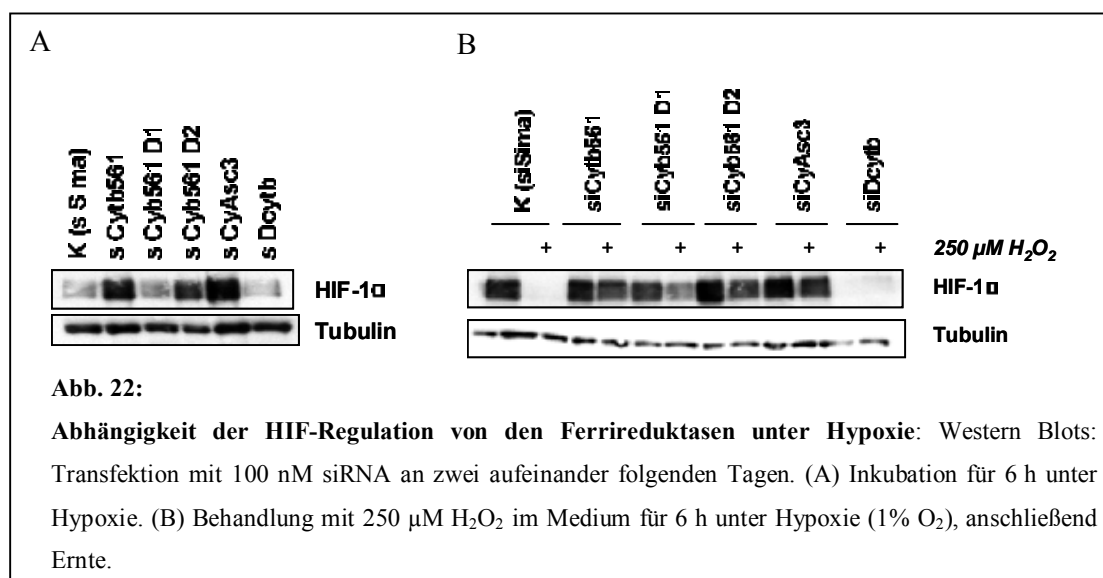


Abb. 22B zeigt, dass eine Inkubation mit ROS zu einem fast vollständigen Abbau von HIF in der Kontrolle führte. Ein *knock down* der Ferrireduktasen hingegen führte zu einer Verminderung der ROS-vermittelten Reduktion der HIF-Expression. Insbesondere die Transfektion mit siCytb561 und siCyAsc3 hob die destabilisierende Wirkung von H₂O₂ auf HIF fast vollständig auf. Die reduzierende Aktivität der Ferrireduktasen scheint also durch exogene ROS moduliert zu werden, denn der ROS-vermittelte destabilisierende Effekt auf HIF wird durch einen funktionalen Verlust der Ferrireduktasen aufgehoben.

3.7 Etablierung eines HIF-Tet-ON-Systems in Glioblastom-Zelllinien

Das HIF-System spielt eine wichtige regulatorische Rolle bei der Aktivierung von Mechanismen, die zur Adaption des Tumors an seine Mikroumgebung beitragen. Diese Rolle von Hypoxie-induzierbaren Faktoren im Glioblastom sollte mittels eines induzierbaren Systems weiter untersucht werden. Mit dem Tet-ON-System sollte die HIF-Expression moduliert werden und die daraus resultierende Wirkung auf die Expression HIF-regulierter Gene untersucht werden. Des Weiteren sollte der Einfluss auf das Zell- bzw. Tumorwachstum, welches durch diese Gene beeinflusst wird, analysiert werden.

3.7.1 Etablierung und Screening stabil transfizierter Tet-ON-Zelllinien

Nach der Transfektion mit dem Regulationsplasmid pTet-ON und dem pTet-tTS-Plasmid, das einen Tetracyclin-kontrollierten transkriptionellen *Silencer* sowie eine Antibiotikumsresistenz enthält, wurden die verwendeten G55TL-Zellen, eine Glioblastom-Zelllinie, durch Zugabe von Geneticin (G418) selektioniert. Die benötigte Antibiotikumkonzentration von 1 mg/ml Geneticin war zuvor über eine Toxizitätskurve bestimmt worden. Dies geschah durch Zugabe des Antibiotikums in verschiedenen Konzentrationen, ausgewählt wurde die niedrigste Konzentration, bei der alle Zellen ohne Resistenz abstarben (nicht gezeigt).

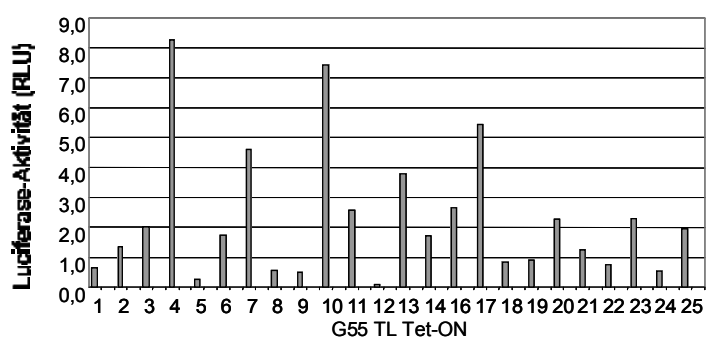


Abb. 23

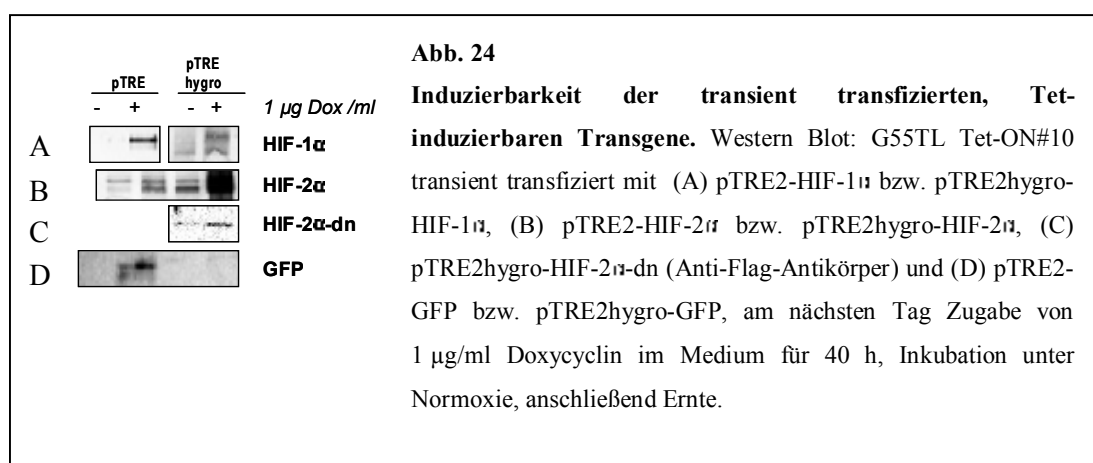
Induzierbarkeit des pTet-ON-Systems. Luciferase-Reporter-Assay: Transfektion der Tet-ON-Zellen mit 150 ng pUHC 13-3 (Tet-induzierbare Luciferase) und 1,5 ng pSV40-RL pro Well. 1 µg/ml Doxycyclin im Medium für 40 h, Inkubation unter Normoxie, anschließend Ernte. Bestimmung der Luciferase-Aktivität in RLU.

Nach ungefähr drei Wochen konnten 25 resistente Kolonien isoliert und weiter kultiviert werden. Diese Zellen wurden mit Hilfe eines Tet-induzierbaren Luciferase-Reporter-

Konstrukts auf die Induzierbarkeit des Transgens sowie auf eine niedrige Hintergrund-Expression hin untersucht. Dazu wurden die Zellen transient mit dem Tet-induzierbaren Luciferase-Reporter-Konstrukt pUHC 13-3 sowie einem SV40-Promotor-gesteuerten Renilla-Luciferase-Konstrukt zur internen Kontrolle transfiziert. Dann wurden die Zellen in An- bzw. Abwesenheit von 1 µg/ml Doxycyclin, einem Tetracyclin-Analogon, im Medium für 40 h weiter kultiviert. Nach der Ernte wurde die Reporteraktivität gemessen. Abbildung 23 zeigt exemplarisch einen repräsentativen Versuch zur Induktion des Reporter-Konstrukts: Die Induktionshöhe des Reporters durch Doxycyclin-Gabe ist in den untersuchten Klonen sehr unterschiedlich; auch die Variabilität zwischen den Wiederholungsversuchen war sehr groß. Nach dreimaliger Wiederholung des Luciferase-Assays mit den viel versprechendsten Klonen wurden G55TL Tet-ON #4 und G55TL Tet-ON #10 aufgrund ihrer hohen Induzierbarkeit bei einer niedrigen Hintergrundexpression für die weiteren Transfektionen verwendet.

3.7.2 Etablierung und Screening stabil transfizierter Tet-ON-HIF-Klone

Die zu verwendenden HIF-Konstrukte sowie GFP wurden zunächst transient in den Tet-ON-Zellen getestet. Dafür wurden die Response-Plasmide pTRE2-HIF-1α, pTRE2hygro-HIF-1α, pTRE2-HIF-2α, pTRE2hygro-HIF-2α, pTRE2hygro-HIF-2α-dn, pTRE2-GFP sowie pTRE2hygro-GFP transient in die Glioblastom-Linie transfiziert und die Expression mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Abb. 24 zeigt, dass in G55TL Tet-ON#10 alle untersuchten Response-Plasmide eine Induktion nach Zugabe von Doxycyclin zeigten.



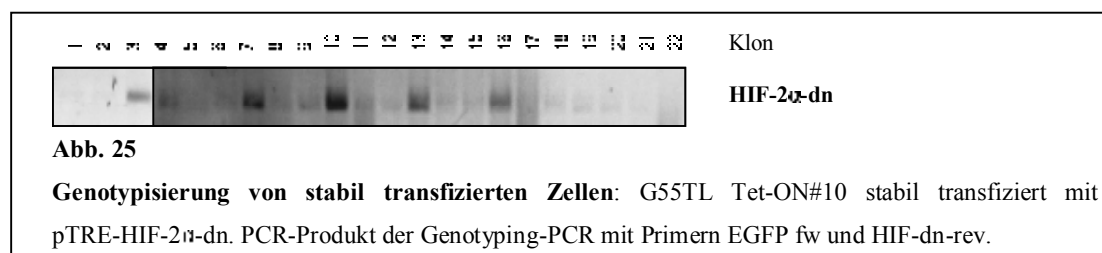
Nun wurden zunächst die zu untersuchenden Zellen mit den verschiedenen Konstrukten im Response-Plasmid pTRE2 stabil transfiziert. Es stellte sich jedoch heraus, dass bei einer Ko-Transfektion mit dem Selektionsplasmid pTK-Hyg die Effizienz der Ko-Transfektion

sehr gering war. Aus diesem Grund wurden alle Konstrukte in das Responseplasmid pTRE2hyg kloniert, das sowohl das *tet response element* als auch eine Hygromycin-Resistenz enthält. Mit diesem Konstrukt konnte die Transfektionseffizienz deutlich erhöht werden. Auch hier war die nötige Antibiotikumkonzentration von 200 µg/ml über eine Toxizitätskurve bestimmt worden. Nun wurde wiederum mit Hilfe des Antibiotikums selektioniert und die überlebenden Kolonien isoliert. Die weitere Charakterisierung dieser Kolonien erfolgte für alle Klone wie im Folgenden exemplarisch für HIF-2α-dn gezeigt. Unten stehende Tabelle zeigt die Ergebnisse für alle untersuchten Klone im Überblick.

Konstrukt	Anzahl der untersuchten Klone	Anzahl der induzierbaren Klone
pTREhygro-HIF-1α	30	5
pTREhygro-HIF-2	32	8
pTREhygro-HIF-2α-dn	63	5

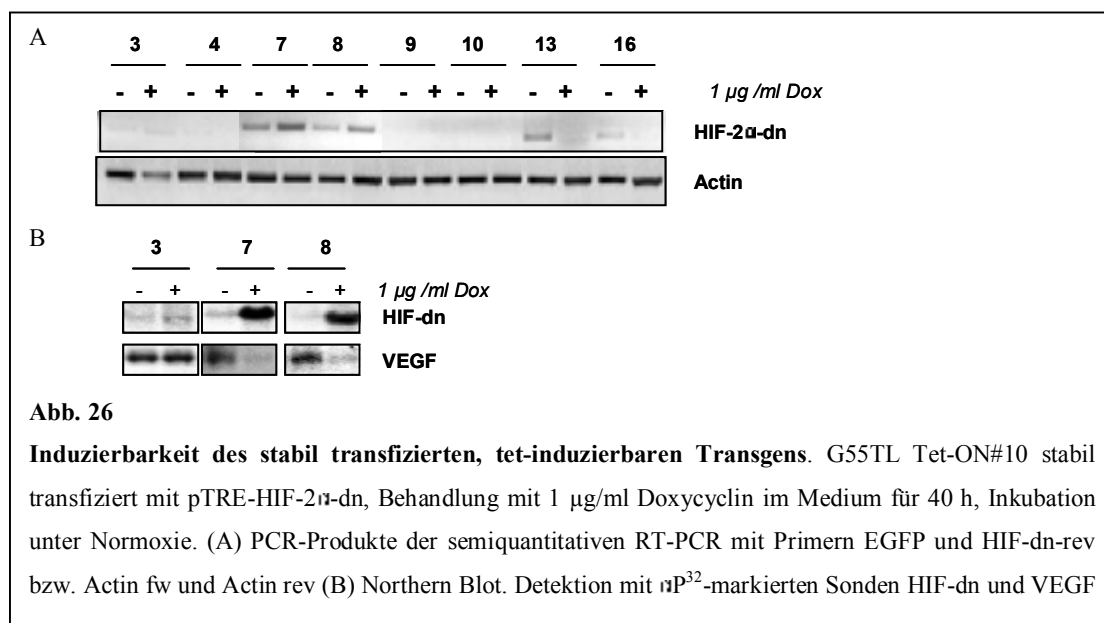
3.7.3 Induzierbarkeit der Transgene HIF-2α-dn

Diese isolierten Kolonien wurden zunächst mit Hilfe einer Genotyping-PCR auf die Anwesenheit des Transgens untersucht. Dazu wurde ein Teil der Zellen wie unter 2.7.2 beschrieben lysiert und das Lysat direkt in die PCR eingesetzt.



Die in der PCR für das entsprechende Transgen positiven Zellen (Abb. 25: Klone 3, 4, 7, 8, 9, 10, 13, 16) wurden nun auf die Induzierbarkeit des Transgens hin untersucht, da die Expression auch von Faktoren wie der Insertionsstelle im Genom abhängig ist. Dazu wurden die Zellen für 40 h mit und ohne Doxycyclin kultiviert. Dann wurde RNA isoliert und in einer reversen Transkriptionsreaktion in cDNA umgeschrieben. Mit dieser cDNA wurden dann semiquantitative PCRs zur Untersuchung der Expressionshöhe des entsprechenden Transgens sowie für Actin als Kontrolle des allgemeinen Expressionsniveaus durchgeführt.

Abb. 26A zeigt, dass in Klon 7 und schwächer auch in Klon 8 nach Doxycyclin-Zugabe eine höhere Expression von HIF-2 α -dn zu sehen ist. Klon 10, der zwar den HIF-dn-Genotyp aufweist (siehe Abb. 25) zeigt dagegen keine Induktion auf RNA-Ebene. Außerdem ist bei einigen Klonen eine „leaky“ Expression des Transgens auch ohne Doxycyclin-Gabe zu erkennen (Klone 13 und 16). Die ausgewählten Klone 7 und 8, die in der semiquantitativen RT-PCR eine deutliche Induktion des Transgens zeigten, wurden dann weiteren Untersuchungen der Induzierbarkeit, des Expressionsniveaus sowie des Einflusses auf die HIF-Targetgen-Expression mittels Northern Blot unterzogen.



Mit Hilfe von Northern Blots konnte die Induzierbarkeit der Transgene auf RNA-Ebene qualitativ und quantitativ sowie der Effekt der Transgenexpression auf HIF-Targetgene untersucht werden. Dazu wurde RNA aus Doxycyclin-behandelten und -unbehandelten Zellen über ein Formaldehydgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und diese mit Sonden für das Transgen und Targetgene hybridisiert. In Abb. 26B wurde das Transgen HIF-dn und exemplarisch das HIF-Targetgen VEGF untersucht. Man sieht, dass die Doxycyclin-Gabe in den beiden Klonen 7 und 8 eine HIF-2 α -dn-Expression induziert, in dem als Negativkontrolle verwendeten Klon 3 dagegen nicht. Die Expression des HIF-Targetgens VEGF wird unter Hypoxie durch HIF induziert. Bei einer hohen Expression von HIF-2 α -dn nach Zugabe von Doxycyclin ist durch dessen dominant-negative Wirkung eine Verminderung der Expression des HIF-Targetgens VEGF in den Zellen auch unter hypoxischen Bedingungen zu sehen. Wie Abbildung 26B zeigt, ist die VEGF-Expression

bei Klon 3 auch nach Doxycyclin-Gabe unverändert. Bei den Klonen 7 und 8 dagegen ist eine deutliche Verminderung der VEGF-mRNA in Folge der HIF-dn-Expression zu erkennen.

3.7.4 Induzierbarkeit von HIF-1 α und HIF-2 α

Auch die Charakterisierung der mit pTREhygro-HIF-1 α und pTREhygro-HIF-2 α transfizierten Zellen mittels RT-PCR und Northern Blot zeigte in einigen Klonen eine deutliche Induktion des Transgens (nicht gezeigt). Zur genaueren Quantifizierung der Expressionshöhe wurden quantitative *real time* PCRs durchgeführt (Abb. 27A und B). Abbildung 27A zeigt, dass die HIF-1 α -Klone 15, 20, 21 und 23 auf RNA-Ebene eine Induktion des Transgens nach Doxycyclin-Zugabe um das 15- bis 35fache aufwiesen. Auch die stabil mit pTREhygro-HIF-2 α transfizierten Zellen zeigten, wie in Abbildung 27B dargestellt, zum Teil eine deutliche Induktion des Transgens, wie zum Beispiel Klon 2 um das 4,5fache bzw. Klon 24 um das 6fache.

Im nächsten Schritt sollte die Induktion der Transgene auf Proteinebene untersucht werden. Dazu wurden die positiv getesteten Zellen in An- und Abwesenheit von Doxycyclin unter Normoxie und Hypoxie inkubiert und anschließend geerntet. Die Proteinlysate wurden mittels Western Blot analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die in vielen der Zellklone deutlich sichtbare Induktion der Transkription des Transgens durch Doxycyclin-Behandlung nicht zu einer Zunahme der Proteinmenge (Abb. 27C und D) führte, sondern im Gegenteil sogar zu einem Abbau von endogenem HIF auch unter Hypoxie. Besonders deutlich wird dies beispielsweise bei den HIF-1 α -Klonen 15 und 20: Unter hypoxischen Bedingungen ist eine deutliche Induktion von HIF-Protein zu sehen, nach Zugabe von Doxycyclin jedoch wieder eine Verringerung. Eigentlich wäre in diesen Klonen eine Erhöhung des HIF-Gehaltes zu erwarten, da auf RNA-Ebene eine 15fache bzw. 35fache Induktion zu sehen war. In Klon 23 ist zwar kein Abbau von HIF nach Doxycyclin-Gabe zu sehen, aber auch keine zusätzliche Erhöhung der HIF-Menge. Das induzierte HIF (15fache Induktion auf RNA-Ebene) könnte hier den Abbau gerade kompensieren.

3.7.5 Wirkung von Doxycyclin auf die Stabilität von HIF

Da die Möglichkeit bestand, dass mit einer ungeeigneten Konzentration Doxycyclin gearbeitet worden war und um toxische Effekte auszuschließen, wurden verschiedene

Konzentrationen des Antibiotikums auf ihre Wirkung getestet. Bei der bisher verwendeten Konzentration von 1 µg/ml handelte es sich um die vom Hersteller empfohlene Menge. So wurde zunächst untersucht, ob eine ausreichende Induktion der Transgene auch schon bei niedrigeren Doxycyclin-Konzentrationen erreicht werden könnte.

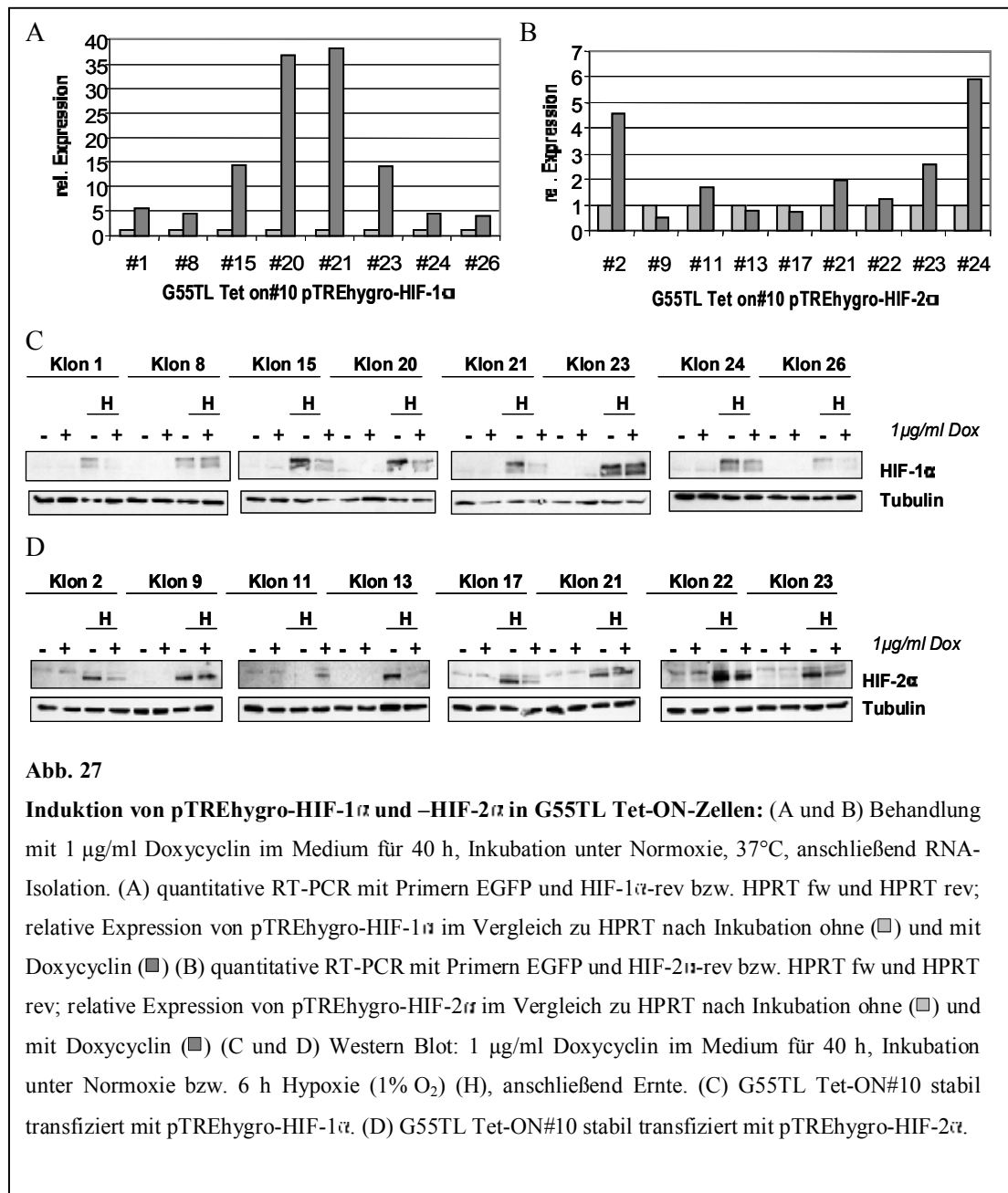
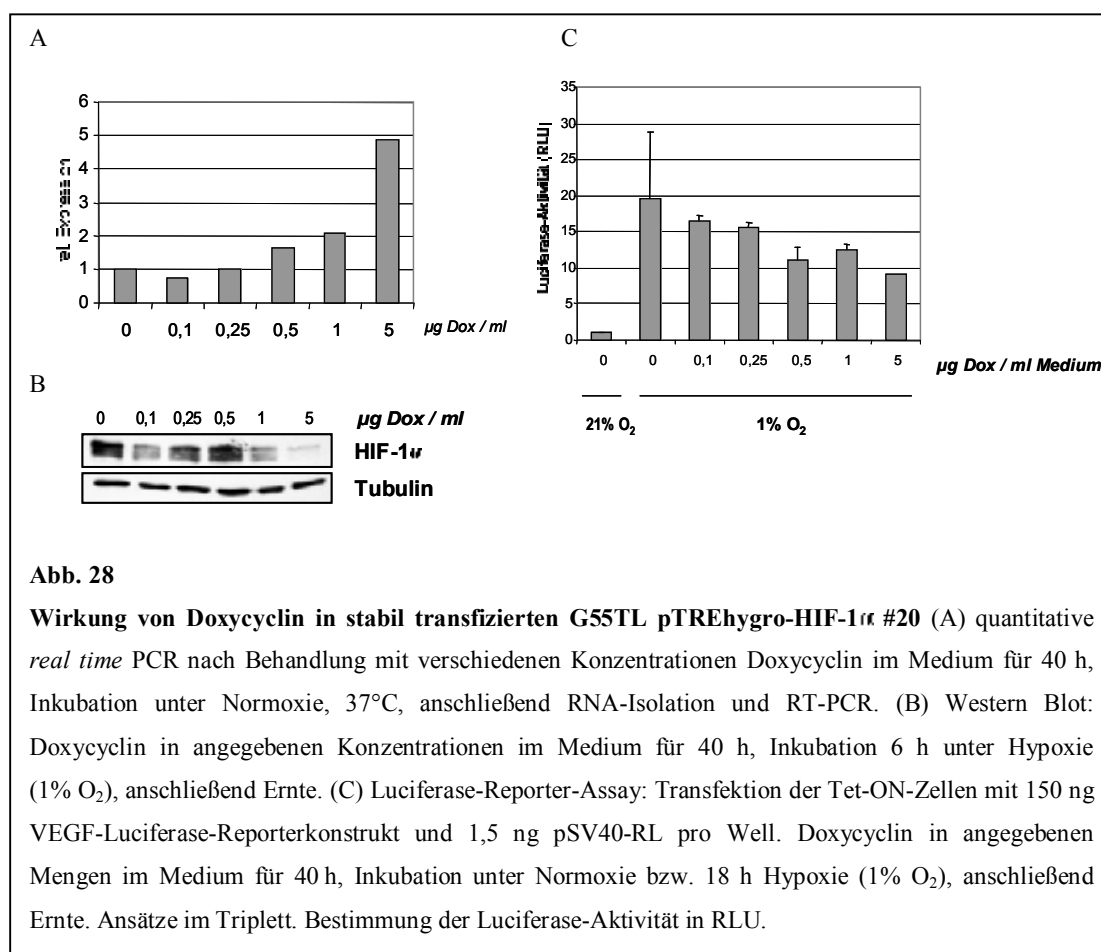


Abb. 27

Induktion von pTREhygro-HIF-1α und -HIF-2α in G55TL Tet-ON-Zellen: (A und B) Behandlung mit 1 µg/ml Doxycyclin im Medium für 40 h, Inkubation unter Normoxie, 37°C, anschließend RNA-Isolation. (A) quantitative RT-PCR mit Primern EGFP und HIF-1α-rev bzw. HPRT fw und HPRT rev; relative Expression von pTREhygro-HIF-1α im Vergleich zu HPRT nach Inkubation ohne (□) und mit Doxycyclin (■) (B) quantitative RT-PCR mit Primern EGFP und HIF-2α-rev bzw. HPRT fw und HPRT rev; relative Expression von pTREhygro-HIF-2α im Vergleich zu HPRT nach Inkubation ohne (□) und mit Doxycyclin (■) (C und D) Western Blot: 1 µg/ml Doxycyclin im Medium für 40 h, Inkubation unter Normoxie bzw. 6 h Hypoxie (1% O₂) (H), anschließend Ernte. (C) G55TL Tet-ON#10 stabil transfiziert mit pTREhygro-HIF-1α. (D) G55TL Tet-ON#10 stabil transfiziert mit pTREhygro-HIF-2α.

Abbildung 28A zeigt die konzentrationsabhängige Induktion der RNA-Expression von pTREhygro-HIF-1α in Klon 20 in der quantitativen *real time* PCR. Ab einer Konzentration von 0,5 µg Doxycyclin/ml ist eine Induktion zu erkennen, bei einer Konzentration von 5

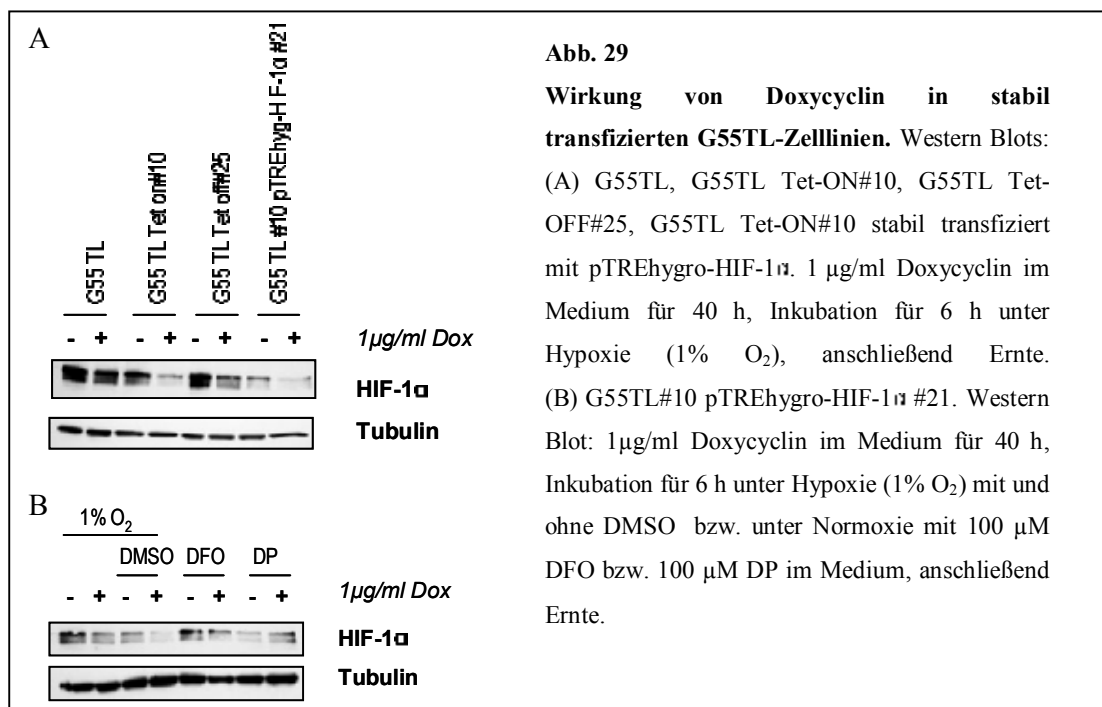
$\mu\text{g/ml}$ war hier sogar eine noch höhere Induktion zu erreichen als durch $1 \mu\text{g/ml}$. Die gleichen Konzentrationen wurden auf ihre Wirkung auf die Proteinmenge hin im Western Blot analysiert. Eine Untersuchung von HIF-1 α -Proteinen nach einer Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Doxycyclin zeigte jedoch selbst unter hypoxischen Bedingungen schon ab einer Konzentration von $0,1 \mu\text{g/ml}$ einen Rückgang der HIF-Menge (Abb. 28B). Auch eine Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der HIF-Aktivität im Luciferase-Reporter-Assay zeigte eine Reduktion der Reporter-Aktivität bei Konzentrationen über $0,5 \mu\text{g/ml}$ (Abb. 28C). Dies ist jedoch die niedrigste Konzentration, die auf RNA-Ebene zu einer Induktion führte, so dass die Möglichkeit, in einem anderen Konzentrationsbereich zu arbeiten, somit ausschied.



Um auszuschließen, dass es sich bei dem beobachteten Effekt um ein durch die Transfektion ausgelöstes Artefakt handelte, wurden auch nicht transfizierte G55TL-Zellen sowie mit anderen Konstrukten transfizierte Zellen auf die Wirkung einer Doxycyclin-Gabe hin untersucht. Wieder wurden die Zellen in An- bzw. Abwesenheit von $1 \mu\text{g/ml}$

Doxycyclin inkubiert. Abb. 29A zeigt, dass der destabilisierende Effekt in den untransfizierten G55TL-Zellen recht gering ist, sobald die Zellen jedoch mit verschiedenen Konstrukten transfiziert wurden, führt die Zugabe von Doxycyclin zu einer Herabregulation von HIF.

Ein Wirkmechanismus könnte die Bildung von Radikalen beim Abbau von Doxycyclin, das sehr lichtempfindlich ist (www.sigmaaldrich.com), sein. Diese Radikale könnten für den Abbau von HIF verantwortlich sein. Um einen solchen Mechanismus zu verhindern, wurden zum einen alle Versuche in abgedunkelten Räumen wiederholt, was zu unveränderten Ergebnissen führte (nicht gezeigt). Außerdem wurde dem Zellkulturmedium neben Doxycyclin ein Radikalscavenger (DMSO) zugegeben. Des Weiteren wurde die Wirkung von Doxycyclin auf durch Eisenchelatoren (DFO, DP) induziertes HIF mittels Western Blot untersucht. Diese Versuche führten ebenfalls nicht zu einer zusätzlichen Induktion der HIF-Expression durch Doxycyclin (Abb. 29B).



Da eine Stabilisierung des Proteins eine unabdingbare Voraussetzung für weitere Untersuchungen gewesen war, konnten die generierten stabilen Zellen nicht für weitere Versuche genutzt werden.

Eine mögliche Alternative, um die geplanten Untersuchungen weiterzuführen, ist die Etablierung eines Tet-OFF-Systems, in dem die Transgene in Abwesenheit von Doxycyclin induziert werden. Hier würde die beobachtete inhibierende Wirkung also den gewünschten Effekt sogar noch verstärken. Die beschriebenen Zelllinien wurden mit einem Tet-OFF-Regulator-Plasmid stabil transfiziert und die Klone analysiert, um mit Hilfe dieses Systems die hier begonnenen Untersuchungen fortführen zu können. Mit diesem System konnten Zellen generiert werden, bei denen die HIF-Expression durch Doxycyclin stabil induziert bzw. reguliert werden kann. Dies fand jedoch nicht mehr im Rahmen der vorliegenden Arbeit statt.

4 Diskussion

Die Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und HIF-2 α sind die zentralen Regulatoren der Adaption von Gewebe an eine hypoxische Umgebung. Über den genauen Mechanismus, der die Sauerstoff-Detektion in den Zellen höherer Lebewesen regelt, ist bislang wenig bekannt. Trotz einer wachsenden Anzahl von Befunden zur Regulation der Transkriptionsfaktoren sind die genauen Funktionen vieler Moleküle und ihre Interaktionen mit HIF noch immer ungeklärt. Da die Sauerstoff-Signalwege und das HIF-System über Eisenchelatoren, Kobaltionen und Hypoxie aktiviert werden, wurde vermutet, dass es sich bei dem zentralen Sauerstoffsensor um ein Ferroprotein oder ein eisenhaltiges Hämprotein wie die mitochondriale Cytochrom *c* Oxidase oder die NADPH-Oxidase handeln könnte. Die Stabilität und Aktivität von HIF wird darüber hinaus über Hydroxylierungen durch die Prolylhydroxylasen und die Asparagylhydroxylase FIH kontrolliert. Unter diesen Aspekten sollte die Rolle von ROS in der Stabilisierung und Aktivierung von HIF und ihr Einfluss auf die Prolylhydroxylasen untersucht werden. Die dabei identifizierte Enzymfamilie der Ferrireduktasen wurde näher charakterisiert und ihre Rolle im Rahmen der Regulation von HIF analysiert.

4.1 Der Einfluss von Sauerstoffradikalen auf die Regulation von HIF unter Normoxie und Hypoxie

Verschiedene Studien haben einen Einfluss von Sauerstoffradikalen, ROS, auf die Regulation von Sauerstoff-Sensorik und -Signalwegen gezeigt. Sauerstoffradikale beeinflussen den Redox-Zustand der Zelle und damit viele Molekül-Interaktionen. Die Balance innerhalb der Zelle wird durch ein Gleichgewicht zwischen der Bildung von ROS und deren Eliminierung durch Enzyme mit antioxidativer Wirkung aufrechterhalten. Hauptproduzenten von ROS sind die Enzyme der Atmungskette in den Mitochondrien und die NADPH-Oxidasen (NOX) sowie die Xanthin-Oxidase/Dehydrogenase. Die Reduktion der ROS-Level wird vor allem durch die Glutathion-Peroxidase (GPX) und Superoxid-Dismutase (SOD) im Zytosol und den Mitochondrien, sowie durch Katalase in Peroxisomen kontrolliert. Beide zytosolischen Enzyme, GPX und SOD, haben jedoch einen relativ hohen K_m -Wert für H_2O_2 , so dass es darüber hinaus möglich ist, dass niedrigere Konzentrationen nicht-enzymatisch durch die Fenton-Reaktion im endoplasmatischen Retikulum abgebaut werden (Review: Kamata und Hirata 1999). In der

Fenton-Reaktion entstehen dabei unter Oxidation von Eisen $\cdot\text{OH}$ -Radikale, die dann direkt oder indirekt auf Transkriptionsfaktoren wie HIF wirken können (Huang, Arany *et al.* 1996; Wiesener, Turley *et al.* 1998).

Um die Rolle von Sauerstoffradikalen in der Regulation von HIF weiter zu untersuchen, wurde die in den Zellen vorhandene Menge an ROS exogen verändert. Zur Verringerung des ROS-Gehalts der Zellen wurde ein Antioxidanz, der Radikalscavenger NMPG (N-(2-Mercaptopropionyl)glycin), zugegeben. Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid konnte die ROS-Menge erhöht werden.

Eine Behandlung mit dem Radikalscavenger NMPG unter Normoxie und damit eine Reduzierung von Radikalen im Medium führt zu einer Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α vergleichbar mit unter Hypoxie inkubierten Zellen. Diese Beobachtung unterstützt die Studien von Fandrey, Frede *et al.* 1994), die eine Induktion des HIF-Targetgens EPO nach Reduktion der Sauerstoffradikale im Medium durch Zugabe eines Scavengers beobachteten. Auch eine Induktion von HIF-1 α und HIF-2 α selbst ist nach Zugabe von NMPG beobachtet worden (Wiesener, Turley *et al.* 1998), und eine Arbeit zeigt, dass die Neutralisierung von Hydroxylionen im endoplasmatischen Retikulum zu einer Stabilisierung von HIF unter Normoxie führt (Liu, Berchner-Pfannschmidt *et al.* 2004).

Wenn Zellen nach einer Induktion von HIF durch Verringerung des $p\text{O}_2$ wieder unter normoxischen Bedingungen inkubiert werden, ist die Stabilität des Proteins sehr gering, und es ist nach wenigen Minuten nicht mehr nachweisbar. Dieser schnelle Abbau von HIF könnte ebenfalls ROS-vermittelt sein, da die Produktion von Sauerstoffradikalen in Zellen im Stadium der Reoxygenierung nach einer hypoxischen Phase besonders erhöht ist. Unter Hypoxie liegt das Enzym Xanthin-Dehydrogenase, das Xanthin und Hypoxanthin unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff zu Superoxid und H_2O_2 oxidiert, als Xanthin-Oxidase vor (Gohmann 1998). Während einer Reoxygenierung, d.h. sobald wieder ausreichend Sauerstoff zur Verfügung steht, wird die Dehydrogenase-Aktivität wieder hergestellt und es werden vermehrt Radikale gebildet (Kelley, Hock *et al.* 2006). Darüber hinaus werden auch durch die Mitochondrien während der Reoxygenierung Sauerstoffradikale gebildet.

Eine Reoxygenierung von Zellen in Anwesenheit des Scavengers NMPG führt zu einer Verringerung der Radikale im Medium. Der schnelle Abbau von HIF unter Normoxie (nach 20 min vollständiger Abbau) konnte durch diese Reduktion der Radikale deutlich verlangsamt werden, so dass HIF auch noch nach einer Stunde Inkubation unter Normoxie nachzuweisen war. Eine Reduktion der Sauerstoffradikale im Medium führt also zu einer Stabilisierung von HIF unter Normoxie und während einer Reoxygenierungsphase.

Fandrey, Frede *et al.* 1994 konnten in HepG2-Zellen zeigen, dass diese Zellen Sauerstoffradikale in Abhängigkeit vom perizellulären O_2 -Druck produzieren: unter Normoxie ist die Produktion maximal, die Abnahme des pO_2 führt zu einer Reduktion. Wenn die H_2O_2 -Produktion pO_2 -abhängig ist, so sollte die externe Erhöhung von H_2O_2 in hypoxischen Zellen einen hohen pO_2 imitieren und somit die HIF-abhängige Genexpression unterbinden. Um dies zu untersuchen, wurden verschiedene Glioblastom-Zelllinien unter Hypoxie mit H_2O_2 behandelt und der Effekt auf HIF untersucht. Diese Behandlung führte in allen untersuchten Zelllinien zu einer deutlichen Reduktion des detektierbaren HIF-Proteins. Da es sich um aus Patientenmaterial etablierte Zelllinien handelt, ist die unterschiedliche Sensibilität auf Unterschiede im Genotyp zurück zu führen. Mit Hilfe einer quantitativen PCR konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von HIF-1 α durch die Zugabe von Sauerstoffradikalen nicht verändert wird, so dass die reduzierte Proteinmenge, die im Western Blot detektiert wird, eindeutig auf eine posttranskriptionelle Regulation zurückzuführen ist. Die Reduktion in der Expression von HIF-Targetgenen, wie sie mittels der quantitativen PCR und einem Luciferase-Reporter-Assay gezeigt werden konnte, zeigt darüber hinaus, dass die transkriptionelle Aktivität von HIF ebenfalls reduziert war und belegt somit die biologische Relevanz des beobachteten Effekts.

Studien über die Wirkung von Sauerstoffradikalen auf HIF führen, wie eingangs erwähnt, häufig zu sehr unterschiedlichen und sogar gegensätzlichen Ergebnissen in Abhängigkeit davon, ob es sich um normoxische, hypoxische oder Wachstumsfaktor-vermittelte Signalwege handelt. Beispielsweise führt die Überexpression des ROS-produzierenden Enzyms SOD zu einer vermehrten Produktion von Radikalen und zu einer Aktivierung von HIF, während die Überexpression von ROS-neutralisierenden Enzymen wie der Glutathion-Peroxidase oder Katalase zu einer Destabilisierung von HIF führt (BelAiba, Djordjevic *et al.* 2004). Auch eine exogene Erhöhung unter Normoxie, wie beispielsweise

in H₂O₂-behandelten glatten Aortenmuskelzellen führt zu einer Heraufregulation von HIF-1 α (Gorlach, Diebold *et al.* 2001). Interessanterweise verursachen viele der in der Literatur beschriebenen Stimuli, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren oder das Hormon Angiotensin II, die HIF unter Normoxie stabilisieren, ebenfalls eine Erhöhung der ROS-Level. So zeigten Richard, Berra *et al.* (2000) und Haddad und Land (2001), dass eine Erhöhung der Sauerstoffradikale unter Normoxie durch Ang II bzw. TGF- α zu einem Anstieg der HIF-Proteinmenge führt. Hier wird ein *p*O₂-unabhängiger Mechanismus diskutiert, der über die Proteinkinase C zu einer erhöhten mRNA-Transkription und über eine Aktivierung von eIF-4F über die PI3K / p70S6K / mTOR-Signalwege zu einer erhöhten Translationsrate von HIF führt (Page, Robitaille *et al.* 2002). Kürzlich wurde darüber hinaus ein weiterer Mechanismus der ROS-vermittelten HIF-Induktion vorgeschlagen: in JunD^{-/-}-Zellen akkumulieren ROS und HIF wird ebenfalls stabilisiert (Gerald, Berra *et al.* 2004). Dies wird hier darauf zurückgeführt, dass mehr Eisen oxidiert und die Verfügbarkeit von Fe²⁺ vermindert ist, so dass die Aktivität der Prolylhydroxylasen sinkt. Im Gegensatz dazu wurde eine Destabilisierung von HIF durch ROS in mehreren Studien gezeigt (Huang, Arany *et al.* 1996; Genius und Fandrey 2000; Kietzmann, Fandrey *et al.* 2000; Wartenberg, Ling *et al.* 2003; Yang, Zhang *et al.* 2003). Dies wurde als Folge einer Aktivierung der proteosomalen Abbauwege durch ROS interpretiert.

Eine exogene Erhöhung der Sauerstoffradikale im Medium zeigt in den hier untersuchten Zellen ebenfalls eine unterschiedliche Wirkung: unter Normoxie ist eine kurzfristige Stabilisierung von HIF zu sehen (die kurzfristige Wirkung von H₂O₂ konnte unter Hypoxie aus technischen Gründen nicht untersucht werden), in den nach einer längeren Inkubationszeit untersuchten hypoxischen Zellen führte die H₂O₂-Behandlung zu einer Destabilisierung von HIF. Eine Veränderung des Redox-Zustandes der Zellen durch exogene Erhöhung der Sauerstoffradikale hat also zunächst kurzfristig unter Normoxie andere Folgen als unter Hypoxie und nach einer Inkubation für mehrere Stunden. Der unter Normoxie beobachtete stabilisierende Effekt lässt vermutlich nach, da H₂O₂ nach 30 bis 40 min metabolisiert ist (Davies 1999).

Diese unterschiedliche Regulation unter Normoxie und Hypoxie weist auch Parallelen zur Wirkung von NO und NO-Donatoren auf HIF auf: NO und von NO abgeleitete Moleküle spielen ebenfalls eine Rolle in der Hypoxie-vermittelten Signaltransduktion. Unter

Normoxie stimuliert NO die Akkumulation von HIF (Review: Brune und Zhou 2003). Als zugrunde liegender Mechanismus wird vermutet, dass NO die Prolylhydroxylasen hemmt, so dass HIF nicht abgebaut wird. Es wird angenommen, dass NO die PHDs über eine direkte Bindung inhibiert, da das Molekül bekanntermaßen an eisenhaltige Enzyme bindet (Metzen, Zhou *et al.* 2003). Des Weiteren wird eine Aktivierung des PI3K-Signalwegs diskutiert (Kasuno, Takabuchi *et al.* 2004). Unter hypoxischen Bedingungen findet dagegen ein umgekehrter Mechanismus statt: RNI inhibieren die HIF-Stabilisierung und -Aktivierung (Liu, Christou *et al.* 1998; Sogawa, Numayama-Tsuruta *et al.* 1998; Huang, Willmore *et al.* 1999; Mateo, Garcia-Lecea *et al.* 2003). Hier liegt eine Blockade der mitochondrialen Cytochrom *c*-Oxidase zugrunde, so dass es zu einer intrazellulären Umverteilung des vorhandenen O₂ kommt und den sauerstoffabhängigen PHDs mehr O₂ zur Verfügung steht (Hagen, Taylor *et al.* 2003). Eine weitere mögliche Ursache für die Destabilisierung von HIF unter Hypoxie ist eine Aktivierung der PHDs über eine Erhöhung des verfügbaren Eisens nach NO-Gabe unter Hypoxie (Callapina, Zhou *et al.* 2005) sowie die Wirkung von Radikalen wie ONOO⁻ über noch ungeklärte Mechanismen (Wellman, Jenkins *et al.* 2004).

Die unterschiedliche Wirkung von ROS beschränkt sich daneben nicht nur auf die Dauer der Inkubation oder den umgebenden Sauerstoffdruck, sondern wird auch durch die Konzentration bzw. das Maß an oxidativem Stress beeinflusst (Sandau, Fandrey *et al.* 2001; Wartenberg, Ling *et al.* 2003; Callapina, Zhou *et al.* 2005). Milder oxidativer Stress induziert den HIF-Abbau über das proteosomale System, erhöhter Stress inhibiert das 26-S-Proteasomen, so dass HIF nicht mehr abgebaut wird (Reinheckel, Sitte *et al.* 1998; Reinheckel, Ullrich *et al.* 2000).

Säugerzellen reagieren auf niedrige ROS-Konzentrationen unter 100 µM mit einer erhöhten Proliferationsrate, mittlere Konzentrationen dagegen inhibieren das Wachstum und sehr hohe Konzentrationen über 0,5 mM führen zur Induktion von Apoptose. Mit mittleren Konzentrationen H₂O₂ behandelte Zellen induzieren darüber hinaus eine adaptive Antwort an diesen oxidativen Stress, die allerdings erst nach 18 h ihr Maximum erreicht (Davies 1999). Die in dieser Arbeit verwendeten H₂O₂-Konzentrationen lagen mit 100 µM bis 250 µM unterhalb des toxischen Bereichs. Um eine toxische Wirkung von H₂O₂ auf die untersuchten Zellen trotzdem auszuschließen, wurden die Zellen nach einer Inkubation mit H₂O₂ für verschiedene Zeitspannen unter Normoxie inkubiert und erst im Anschluss daran

unter Hypoxie. Es zeigte sich, dass der destabilisierende Effekt der H_2O_2 -Behandlung nur transienter Natur ist und es sich nicht um einen toxischen Effekt handelt. Die Tatsache, dass die regulatorische Wirkung von ROS auf HIF auch nach einem Mediumwechsel noch zu beobachten war, ist des Weiteren ein Beweis dafür, dass die Regulation nicht durch eine Katalase-vermittelte enzymatische Reaktion verursacht wird. Das Enzym Katalase, das im Serum enthalten sein könnte, katalysiert die Reaktion $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ in den Zellen, so dass man vermuten könnte, dass die Reduktion im HIF-Gehalt nach H_2O_2 -Behandlung auch durch eine erhöhte Produktion von molekularem Sauerstoff verursacht werden könnte. Zum einen ist aber H_2O_2 nach sehr kurzer Zeit metabolisiert und der regulatorische Effekt von H_2O_2 ist über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Zum anderen hat H_2O_2 sowohl bei Inkubation in serumfreiem Medium als auch bei einer Vorinkubation in Anwesenheit des Katalase-Inhibitors Aminotriazol (Margoliash, Novogrodsky *et al.* 1960; Fandrey, Frede *et al.* 1994) weiterhin eine destabilisierende Wirkung auf HIF.

4.2 VEGF wird sowohl durch HIF als auch durch andere Transkriptionsfaktoren reguliert

VEGF ist ein stark Hypoxie-reguliertes Gen, das unter anderem durch HIF aktiviert wird (Forsythe, Jiang *et al.* 1996). Die Inkubation unter Hypoxie führt so auch zu einer 8 bis 10fachen Induktion der VEGF-mRNA-Menge in der quantitativen PCR sowie einer Zunahme auf das 12fache der VEGF-Reporter-Aktivität im Luciferase-Assay. Eine Behandlung mit ROS führt allerdings im Gegensatz zu den anderen untersuchten HIF-Targetgenen zu einer weiteren Hochregulation der VEGF-mRNA. Auch eine Untersuchung der VEGF-Promotoraktivität nach H_2O_2 -Gabe mittels eines Luciferase-Reporters zeigt eine Zunahme der Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Der VEGF-Promotor enthält neben der HRE-Sequenz, die eine Aktivierung durch HIF vermittelt, Bindungs- und Transaktivierungssequenzen für eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, unter anderem für Sp1, Sp3, AP-1, AP-2 und STAT-3. Insbesondere Sp1 und Sp3 werden durch oxidativen Stress stimuliert (Review: Pages und Pouyssegur 2005), der hier durch die Zugabe von H_2O_2 ausgelöst worden sein könnte. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass die Sp1-Bindungsstelle im parallel verwendeten HRE-Reporterkonstrukt, das eine Abnahme der Hypoxie-induzierten Aktivität nach H_2O_2 -Gabe zeigte, deletiert wurde. Dies erklärt die beobachtete Induktion der VEGF-Expression und VEGF-Reporter-Aktivität nach ROS-Behandlung.

Auch nach einer Überexpression der Ferrireduktasen wird VEGF unterschiedlich von den anderen untersuchten HIF-Targetgenen reguliert. Auch hier könnte die Aktivierung weiterer Signalwege und Transkriptionsfaktoren verantwortlich sein, da durch die Überexpression in den Eisenstoffwechsel der Zellen eingegriffen wird.

4.3 Einfluss der NADPH-Oxidase und der Mitochondrien auf die HIF-Regulation

Zusätzlich zu den kontroversen Befunden zum Einfluss von Sauerstoffradikalen auf die Regulation von HIF gibt es unterschiedliche Befunde über einen Anstieg bzw. ein Absinken der ROS-Produktion bei Veränderungen des umgebenden Sauerstoffgehalts. Für die Destabilisierung von HIF unter Normoxie gibt es zwei konkurrierende Modelle: Eine Theorie verbindet die Aktivität der NADPH-Oxidase mit dem Abbau von HIF, dem anderen Modell liegt eine Verminderung der ROS-Produktion in den Mitochondrien zugrunde.

Gegen die Mitochondrien als Ursprungsort der HIF-regulierenden Sauerstoffradikale spricht, dass in ρ^0 -Zellen ohne Mitochondrien bzw. Zellen mit Defekten in der Elektronentransportkette keine Beeinträchtigung der Sauerstoffsensitivität oder HIF-Regulation zu finden ist (Srinivas, Leshchinsky *et al.* 2001; Vaux, Metzger *et al.* 2001; Searle, Hartness *et al.* 2002). $\cdot\text{OH}$ -Radikale werden unter Normoxie vor allem im endoplasmatischen Retikulum (ER) und nicht in Mitochondrien gebildet. Unter Normoxie liegt HIF ebenfalls im endoplasmatischen Retikulum vor – vermutlich durch Interaktion mit pVHL, das ein ER-Lokalisationssignal aufweist (Schoenfeld, Davidowitz *et al.* 2001). *Scavenging* von $\cdot\text{OH}$ -Radikalen, die in der Fenton-Reaktion gebildet werden, führt zur Inhibition der PHDs und damit einer Stabilisierung von HIF (Liu, Berchner-Pfannschmidt *et al.* 2004). Daneben gibt es widersprüchliche Befunde zu den einzelnen Komponenten der mitochondrialen Elektronentransportkette. Eine Inhibition von Komplex I der ETC durch Rotenone führt zu einem Abbau von HIF unter Hypoxie (Chandel, Maltepe *et al.* 1998). Es gibt unterschiedliche Beobachtungen zu den Folgen einer Inhibition von Komplex III – einige Studien (Chandel, McClintock *et al.* 2000; Guzy, Hoyos *et al.* 2005; Mansfield, Guzy *et al.* 2005) zeigten eine Erhöhung der HIF-Menge, während andere Gruppen (Doege, Heine *et al.* 2005; Hagen, Taylor *et al.* 2003) eine Verringerung zeigten. Letztere Gruppe konnte zeigen, dass alle von ihnen verwendeten Inhibitoren der Atmungskette den gleichen destabilisierenden Effekt auf HIF haben. Auch andere

Inhibitoren der Mitochondrien wie NO oder 2-methoxyestradiol führen zu einem Abbau von HIF (Mateo, Garcia-Lecea *et al.* 2003; Hagen, Taylor *et al.* 2003; Hagen, D'Amico *et al.* 2004). In den in dieser Arbeit verwendeten G55TL-Zellen hatte die Inhibition der verschiedenen Komponenten der Atmungskette durch spezifische Inhibitoren der einzelnen Komplexe (Komplex I sowie Q_i und Q_0 in Komplex III) unter Normoxie oder starker Hypoxie keinen Effekt auf HIF. Unter milder Hypoxie dagegen führte die Inhibition zu einer Reduktion von HIF. Diese Daten stimmen mit den Befunden von Doege, Heine *et al.* (2005) überein. Alle diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass es durch die Inhibition der mitochondrialen Atmungskette zu einer Umverteilung des intrazellulären Sauerstoffs kommt. Der unter milder Hypoxie noch vorhandene Sauerstoff ist dabei noch ausreichend für eine Aktivierung der Prolylhydroxylasen. Diese leiten dann durch eine Hydroxylierung den proteosomalen Abbau von HIF ein. Unter beinahe anoxischen Bedingungen dagegen stünde auch nach Inhibition der Atmungskette nicht genügend Sauerstoff für die sauerstoffabhängigen PHDs zur Verfügung.

Ein weiteres Sauerstoffradikale produzierendes Enzym ist die NADPH-Oxidase (NOX), deren Rolle in der Vermittlung der pO_2 -Sensorik ebenfalls umstritten ist. Es gibt eine Reihe von Hinweisen auf eine Rolle der NOX als Hauptquelle für die basale ROS-Produktion in Arterien (Mohazzab und Wolin 2000; Gupte, Kaminski *et al.* 2005), in neuroepithelialen Zellen (Searle, Hartness *et al.* 2002) und anderen Geweben. Im isolierten System zeigen Oxidasen darüber hinaus mit ansteigendem pO_2 eine erhöhte Produktion von Superoxid-Anionen und/oder Wasserstoffperoxid (Review: Wolin, Ahmad *et al.* 2005). Der NADPH-Enzymkomplex besteht aus mindestens 5 Komponenten: zwei zytosolischen Untereinheiten p47phox und p67phox, einem membrangebundenen Cytochrom b558, das aus gp91phox (=NOX2) und p22phox besteht, sowie dem kleinen G-Protein Rac. Das Enzym generiert Superoxid-Anionen auf der extrazellulären Seite der Membran durch die Reduktion von Sauerstoff an der gp91phox-Untereinheit über eine Reduktion von NADPH. Diese gp91phox-Untereinheit wird in verschiedenen Geweben auch durch NOX 1 oder NOX 4 ersetzt (Dusting, Selemidis *et al.* 2005). NOX4 wurde zunächst als *renal Nox* beschrieben und als potentieller Sauerstoffsensor, der die Produktion von EPO kontrolliert, vorgeschlagen (Geiszt, Kopp *et al.* 2000). Das Enzym spielt darüber hinaus eine Rolle in der Regulation von HIF-2 α in RCC-Zellen (Maranchie und Zhan 2005). Eine Überexpression der NOX1 führt zu einer erhöhten ROS-Produktion

und zu einem Abbau von HIF unter Hypoxie, eine Aktivierung der GTPase Rac1 ebenfalls (Wartenberg, Hoffmann *et al.* 2005; Gorlach, Berchner-Pfannschmidt *et al.* 2003).

Sollte eine Oxidase als Sauerstoffsensor fungieren, so müsste durch eine Inhibition der Oxidase-Aktivität die O₂-regulierte Genexpression beeinflusst werden. Um dies zu untersuchen, wurden verschiedene NOX-Inhibitoren eingesetzt. Nach einer Behandlung mit Apocynin, das die Translokation der p47phox- und p67phox-Untereinheit vom Zytoplasma zur Membran und damit die Anordnung der Untereinheiten des Enzyms verhindert (Stolk, Hiltermann *et al.* 1994), ist eine dosisabhängige Stabilisierung von HIF zu beobachten.

Ein weiterer häufig verwendeter, aber weniger spezifischer NADPH-Oxidase-Inhibitor ist DPI (Diphenyleneiodonium) (Pearse und Dodd 1999; Jiang und Dusting 2003). Die Inhibition der NADPH-Oxidase führt in einigen Zelltypen zu einem Abbau von HIF (Gleadle und Ratcliffe 1998; Haddad und Land 2001; Goyal, Weissmann *et al.* 2004), in anderen Modellen zu einer Stabilisierung (Wartenberg, Gronczynska *et al.* 2005; Yang, Zhang *et al.* 2003). In den in dieser Arbeit untersuchten Zellen war bei einer Behandlung mit diesem Inhibitor eine ähnlich unterschiedliche Regulation zu beobachten (nicht gezeigt). Die Ursache für die umstrittene Rolle der NADPH-Oxidase und die widersprüchlichen Befunde in der Hypoxie-Antwort könnte der Wirkmechanismus von DPI sein: Das Molekül bindet ein Elektron aus einem reduzierten Redox-Zentrum, bildet ein Radikal, welches dann kovalent an FAD bindet, so dass kein molekularer Sauerstoff mehr gebunden werden kann (O'Donnell 1993). Allerdings interagiert DPI relativ unspezifisch mit allen Flavoenzymen und inhibiert beispielsweise auch die NO-Synthase und in höheren Konzentrationen auch mitochondriale Enzyme (Li und Trush 1998).

In Verbindung mit dem Befund, dass eine Inhibition der einzelnen Komponenten der Atmungskette nur unter milder Hypoxie einen Effekt hat und dann zu einem Abbau von HIF führt, ist die Stabilisierung von HIF nach einer spezifischen Inhibition der NADPH-Oxidase ein weiterer Hinweis, dass dieses Enzym eine wichtige regulatorische Rolle in der Vermittlung der Hypoxie-Antwort und damit der Stabilisierung und Aktivierung bzw. dem Abbau von HIF spielt. Daneben zeigt eine neuere Arbeit (Griguer, Oliva *et al.* 2006) eine zelltypspezifische Regulation von HIF durch die ebenfalls ROS-produzierende Xanthin-Oxidase.

4.4 Die Regulation von HIF durch ROS ist abhängig von VHL und den PHDs

Der Abbau von HIF unter Normoxie, d.h. in Anwesenheit von Sauerstoff, wird durch pVHL, das *von-Hippel-Lindau-Protein*, vermittelt. In Folge einer Hydroxylierung spezifischer Prolylreste (Pro⁴⁰² und Pro⁵⁶⁴ in HIF-1 α bzw. Pro⁴⁰⁵ und Pro⁵³¹ in HIF-2 α) bindet VHL an HIF. pVHL ist Teil eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, der dann den proteosomalen Abbau von HIF induziert. In VHL-defizienten Tumorzellen wird HIF dagegen nicht abgebaut, was zu einer konstitutiven Expression von HIF-Targetgenen führt (Review: Kim und Kaelin 2003).

Durch den Einsatz solcher VHL^{-/-}-Tumorzellen (RCC10) konnte die Abhängigkeit der Sauerstoffradikal-vermittelten HIF-Regulation von VHL untersucht werden. In VHL-defizienten Nierenzellkarzinom-Zellen war weder eine Induktion von HIF noch eine Sensibilität gegenüber ROS zu beobachten. In RCC-Zellen, in denen VHL rekonstituiert wurde (RCC10-63 / VHL^{+/+}), war dagegen sowohl eine Hypoxie-induzierte Regulation von HIF als auch eine Destabilisierung des Proteins nach ROS-Behandlung zu sehen. Es handelt sich bei dem ROS-vermittelten Abbau also um eine VHL-abhängige Degradation.

Da der Abbau von HIF durch VHL von der Hydroxylierung der Prolylreste abhängig ist (Min, Yang *et al.* 2002; Hon, Wilson *et al.* 2002), wurde auch untersucht, ob die Prolylhydroxylasen ebenfalls in den ROS-vermittelten Abbau involviert sind. Eine Mutation der Prolylreste verhindert, wie durch den Einsatz verschiedener HIF-Konstrukte mit solchen Mutationen gezeigt wurde, den Abbau von HIF nach ROS-Behandlung. Der Abbau von HIF nach einer exogenen Erhöhung der Sauerstoffradikale ist also abhängig von der Hydroxylierung durch die Prolylhydroxylasen und einer anschließenden VHL-vermittelten Degradation.

Diese Daten passen zu einem Modell der Regulation der Sauerstoff-Sensorik auf mehreren Ebenen: Unter Normoxie wird HIF danach konstitutiv synthetisiert, aber PHD-abhängig wieder abgebaut. Darüber hinaus reguliert die NADPH-Oxidase als ROS-Produzent die Stabilität von HIF. Bei einem niedrigen pO_2 unter Hypoxie sinkt die Aktivität der Prolylhydroxylasen und der NADPH-Oxidase und HIF wird stabilisiert, so dass die Expression von HIF-Targetgenen erhöht wird (Acker und Acker 2004).

Für die Hydroxylierungsreaktion, die von den PHDs katalysiert wird, wird Eisen benötigt und 2-Oxoglutarat decarboxyliert, so dass sowohl Eisenchelatoren als auch 2-Oxoglutarat-Analoga zu einer Hemmung der PHD-Aktivität führen. Eine direkte Inhibition der Prolylhydroxylasen durch DMOG, ein 2-Oxoglutarat-Analogon, das durch seine Estergruppe leicht in Zellen eindringen kann (Jaakkola, Mole *et al.* 2001), oder eine Inaktivierung durch die Eisenchelatoren DFO und DP führt demzufolge ebenfalls zu einer Stabilisierung von HIF unter Normoxie. Die Induktion von HIF durch DMOG und DP zeigte sich dabei unempfindlich gegenüber einer H_2O_2 -Behandlung. Nur das durch DFO-Zugabe stabilisierte HIF kann durch die Erhöhung von ROS abgebaut werden. Eine direkte Inaktivierung der Prolylhydroxylasen durch die Zugabe des kompetitiven Hemmstoffes DMOG hat also den gleichen Effekt wie eine Mutation der Prolylbindungsstellen. Eine Inaktivierung durch Zugabe von Eisenchelatoren dagegen führt nur bedingt zu einer irreversiblen Inhibition. Der Unterschied zwischen den beiden verwendeten Eisenchelatoren liegt im von den Molekülen gebundenen Eisen: DP cheliert zweiwertiges Eisen, DFO dagegen dreiwertiges.

Dieser Befund ist ein weiterer Hinweis auf den Einfluss des Redox-Zustandes der Zellen auf die Regulation von HIF. Dass der Redox-Zustand ein wichtiger Modulator der HIF-Aktivität ist, ist wiederholt gezeigt worden (Salceda, Beck *et al.* 1996; Huang, Arany *et al.* 1996; Yang, Zhang *et al.* 2003; Wellman, Jenkins *et al.* 2004; Callapina, Zhou *et al.* 2005). Der Redox-Zustand der Zelle wird beeinflusst und reguliert durch die Balance zwischen Antioxidantien und ROS-produzierenden Enzymen. Exogen kann der Redox-Zustand beispielsweise durch Ascorbat beeinflusst werden. Ascorbat erhöht die Verfügbarkeit von freiem Fe^{2+} und kann an ein Enzym gebundenes Fe^{3+} reduzieren und somit das Enzym reaktivieren (de Jong, Albracht *et al.* 1982; Kivirikko und Myllyharju 1998; Schofield und Zhang 1999). Es wurde postuliert, dass Ascorbat durch seine reduzierende Wirkung so auch die Aktivität der Prolylhydroxylasen erhöht (Knowles, Raval *et al.* 2003).

Eine Behandlung mit Ascorbat führt in den untersuchten Zellen zu einem Abbau des Hypoxie- und DFO-induzierten HIF, analog zur Behandlung mit H_2O_2 jedoch nicht in den DP- und DMOG-behandelten Zellen. Der Abbau von Hypoxie- und DFO-induziertem HIF durch Ascorbat kann durch eine Reaktivierung der Prolylhydroxylasen durch eine Erhöhung des verfügbaren Fe^{2+} erklärt werden. Ascorbat hat jedoch weder nach Inhibition der PHDs durch ein 2-Oxoglutarat-Analogon noch nach Chelatisierung des zweiwertigen

Eisens durch DP einen regulatorischen Effekt auf HIF. Erstaunlicherweise führten somit H_2O_2 und Ascorbat zu ähnlichen Befunden, was auf einen gemeinsamen Regulationsmechanismus, der die Reduktion von Eisen beinhaltet, hinweist.

4.5 Der Fe^{2+} -Gehalt in Zellen steigt nach Behandlung mit Ascorbat und ROS

Eine Messung des Eisengehaltes in Zellen ergab einen hohen Anteil an dreiwertigem Eisen unter Normoxie. Unter aeroben Bedingungen liegt Eisen hauptsächlich als Fe^{3+} vor, da Fe^{2+} mit Citrat und anderen Oxidanzien zur dreiwertigen Form umgewandelt wird. Unter anaeroben Bedingungen liegt dagegen mehr Fe^{2+} vor. Eine Zugabe von Ascorbat führte zu einer erhöhten Reduktion von Eisen. Überraschenderweise lag nach einer Behandlung mit ROS ebenfalls ein Großteil des in den Zellen vorhandenen Eisens in zweiwertiger Form vor.

Da sowohl Ascorbat als auch H_2O_2 den Fe^{2+} -Gehalt in den Zellen erhöhen und beide Substanzen zu einem Abbau von HIF führen, könnte auch durch die exogene Zugabe von Eisen verschiedener Wertigkeiten die Prolylhydroxylase-Aktivität und damit die HIF-Stabilität beeinflusst werden. Eine Behandlung von Zellen vor einer Hypoxie-Inkubation mit FeCl_2 , FeCl_3 und Eisencitrat hatte jedoch keinen Einfluss auf die Stabilität von HIF (nicht gezeigt). Dies könnte daran liegen, dass zweiwertiges Eisen unter physiologischen Bedingungen innerhalb von sehr kurzer Zeit (20 bis 40 sec) in Anwesenheit von Sauerstoff zu dreiwertigem Eisen oxidiert wird (Cohen, Sinet *et al.* 1980), die Prolylhydroxylasen jedoch zweiwertiges Eisen als Kofaktor benötigen. Im Serum ist Eisen an das Transportmolekül Transferrin gebunden und wird über den Transferrinrezeptor in Zellen aufgenommen (Trowbridge und Shackelford 1986). Auch eine Zugabe von Transferrin (Fe^{3+} -gesättigtes Holotransferrin sowie als Kontrolle Apotransferrin) führte zu keinem Ergebnis (nicht gezeigt). Eine zusätzliche Aktivierung durch die exogene Zugabe von dreiwertigem Eisen scheint in den untersuchten Zellen also nicht möglich zu sein.

Die Zugabe von Ascorbat und von H_2O_2 führt jedoch sowohl zu einer Erhöhung des intrazellulären Fe^{2+} -Gehaltes als auch zu einer Destabilisierung von HIF. Des Weiteren haben die Versuche zur Abhängigkeit des ROS-Effektes einen Einfluss der Wertigkeit des chelierten Eisens (DFO im Vergleich zu DP) auf die Sensibilität gegenüber H_2O_2 gezeigt. Dass eine Zugabe von H_2O_2 zu einer Erhöhung von reduziertem Eisen in der Zelle führt, ist

nicht über einen direkten Effekt zu erklären, da H_2O_2 in der Fenton-Reaktion Eisen oxidiert ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$). Gerald, Berra *et al.* (2004) haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass durch eine Akkumulation von ROS die Verfügbarkeit von Fe^{2+} vermindert wird, so dass die Aktivität der PHDs sinkt. H_2O_2 muss also noch einen weiteren, indirekten Effekt haben, der zu einer Reduktion von Eisen führt.

4.6 Die Rolle der Ferrireduktasen

Insgesamt liegt Eisen bei physiologischen pH-Werten und in Gegenwart von Sauerstoff hauptsächlich in seiner unlöslichen oxidierten Form vor. Neben den Prolylhydroxylasen binden auch die meisten anderen Transportsysteme im Körper dagegen das instabile Fe^{2+} . In Hefen, Pflanzen und Bakterien ist eine Reihe von Transmembranproteinen mit eisenreduzierenden Eigenschaften beschrieben, die so genannten Ferrireduktasen (Dancis, Roman *et al.* 1992; Robinson, Procter *et al.* 1999). Für Säugerzellen wurde ein solches Enzym erstmals 2001 durch McKie identifiziert. Diese Ferrireduktase, das duodenale Cytochrom C (Dcytb), wird durch den intrazellulären Eisengehalt sowie unabhängig davon durch Hypoxie hochreguliert und weist eine hohe Homologie zu Cytochrom b561 (Cytb561) auf (McKie, Barrow *et al.* 2001; Ludwiczek, Theurl *et al.* 2005). Dieses ist ebenfalls ein Transmembranprotein, das Reduktionsäquivalente über die Zellmembran transportiert. Dazu benötigt es Eisen in Form von zwei Hämmolekülen, die an konservierten Histidinresten binden (Srivastava, Duong *et al.* 1984; Berczi A 2005). Auf Grund dieser Eigenschaften sind die Enzyme dieser Familie Kandidaten für die Vermittlung der Reduktion von oxidiertem dreiwertigem Eisen zu zweiwertigem Eisen in Abhängigkeit von Ascorbat. Eine Aktivierung der Enzyme kann durch ROS vermittelt werden – zum einen unter Umständen direkt, zum anderen durch eine Erhöhung des intrazellulären Eisengehaltes durch die oxidierende Wirkung von Sauerstoffradikalen. Eine Aktivierung durch eine Veränderung des intrazellulären Eisengehaltes wurde für Dcytb gezeigt (McKie, Barrow *et al.* 2001), wobei bisher keine IRE-Sequenz (*iron responsive element*) in der Promotorregion nachgewiesen wurde (Turi, Wang *et al.* 2006). Vermutlich dient Ascorbat dann bei der Reduktion von Eisen als Elektronendonator und wird zu Dehydroascorbat oxidiert, da die Enzyme eine putative Ascorbat-Bindungsstelle in der cytb561-Domäne aufweisen (Bashtovyy, Berczi *et al.* 2003).

Die Ferrireduktasen als Modulatoren liefern eine Erklärung für die beobachtete unterschiedliche Sensitivität von durch Hypoxie bzw. verschiedene Eisenchelatoren induziertem HIF. Durch eine erhöhte Aktivität der Ferrireduktasen nach der Bildung oder exogenen Zugabe von ROS läge wider Erwarten vermehrt Fe^{2+} in den Zellen vor, wodurch die Aktivität der PHDs erhöht und HIF in verstärktem Maße abgebaut würde. Neben den beiden genannten Proteinen wurden noch drei weitere Homologe, die alle die konservierte cytb561-Domäne aufweisen, untersucht: *Cytochrome b-561 domain containing 1* (Cytb561D1), *Cytochrome b-561 domain containing 2* (Cytb561D2) und das Ascorbat-abhängige Cytochrom 3 (CyAsc3).

Die untersuchten Enzyme weisen eine Ferrireduktase-Aktivität auf. Diese war vorher nur für Dcytb (McKie, Barrow *et al.* 2001) und Cytb561 (Vargas, Herpers *et al.* 2003) nachgewiesen worden.

Die Expression der Ferrireduktasen ist von Zelllinie zu Zelllinie sehr unterschiedlich. Die absoluten Expressionshöhen der Enzyme unterscheiden sich jedoch sowohl zwischen den untersuchten Zelllinien als auch zwischen den Enzymen selbst zum Teil um mehrere *log*-Stufen. Die für Dcytb im Duodenum beschriebene Hypoxie-Regulation (McKie, Barrow *et al.* 2001) war weder in den untersuchten HUVEC-Zellen noch in den Glioblastom-Zelllinien zu sehen, obwohl das Protein auch im Gehirn exprimiert wird (McKie, Latunde-Dada *et al.* 2002). Zum Teil sah man hier sogar eine deutliche Repression durch Hypoxie. Auch die anderen untersuchten Enzyme zeigten keine klare Regulation durch Hypoxie, sondern eine sehr zellspezifische Induktion oder Repression. Eine zelltypspezifische Regulation wurde für Dcytb auch im Lungenepithel und im Duodenum, den beiden Geweben, in denen das Enzym bisher detailliert untersucht wurde, gezeigt (Frazer, Wilkins, 2003; Turi, Wang *et al.* 2006). Hier wurde eine gegensätzliche Regulation bei einer Erhöhung von Eisen beschrieben. Die beobachtete Regulation durch Hypoxie in den hier untersuchten Zelllinien ist nicht mit der Induktion bekannter HIF-Targetgene wie CA IX oder GLUT-1 zu vergleichen. Von Siah2, einem PHD-regulierenden Enzym, ist bekannt, dass die Expression unter Hypoxie stark zeitabhängig reguliert wird. Nach Verringerung des umgebenden Sauerstoffs wird die Expression zunächst stark erhöht, gefolgt von einer Verringerung bei verlängerter oder chronischer Hypoxie (Nakayama, Frew *et al.* 2004). Eine vergleichbare Untersuchung der zeitabhängigen Expression der Ferrireduktasen zeigte, dass diese ebenfalls eine transienten Regulation unterliegen. Die

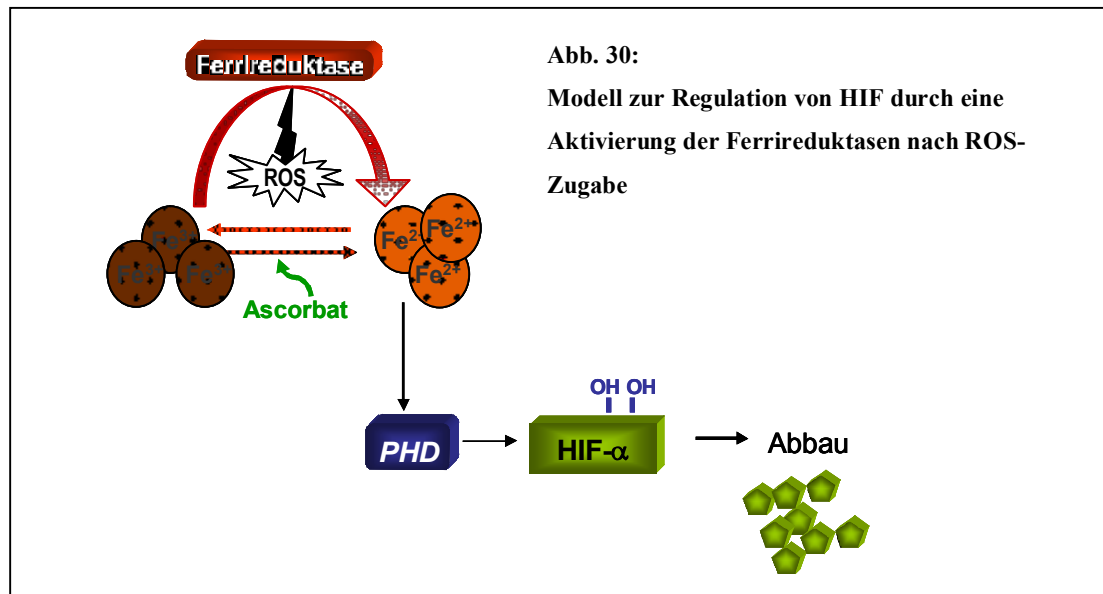
sehr unterschiedlichen Proteinmengen im Western Blot, die in den Überexpressionsversuchen nach Transfektion mit gleichen Mengen des Plasmids nachgewiesen wurden, sprechen darüber hinaus für eine posttranslationale Regulation.

Die untersuchten Ferrireduktasen sind größtenteils zytoplasmatisch lokalisiert, was mit der Lokalisation von HIF und dem Bildungsort von $\cdot\text{OH}$ -Radikalen unter Normoxie übereinstimmt (Liu, Berchner-Pfannschmidt *et al.* 2004). Interessant wäre eine weitere Untersuchung der genauen zellulären Lokalisation der Ferrireduktasen, da eine Ko-Lokalisation mit einem ROS-produzierenden Enzym wie der NADPH-Oxidase zu einer weiteren Erkenntnis über den Funktionsmechanismus führen könnte. Auch die Untersuchung einer Ko-Lokalisation mit HIF oder den PHDs wäre interessant und wurde auch angestrebt, allerdings war dies aus technischen Gründen nicht möglich.

Die biologische Bedeutung der Ferrireduktasen zeigt sich in den Ergebnissen nach einer Überexpression und einem *knock down*. Eine erhöhte Expression der Ferrireduktasen führt zu einem Anstieg an zweiwertigem Eisen, was vermutlich eine Aktivierung der Prolylhydroxylasen mit sich bringt. Dadurch könnte es zu einer verstärkten Hydroxylierung von HIF kommen, was den Abbau des Proteins unter Hypoxie und somit auch die verringerte Expression von HIF-Targetgenen sowie den Rückgang in der HRE-Reporter-Aktivität erklären würde. Ein *knock down* der Ferrireduktasen führt vermutlich zu einer Akkumulation von unlöslichem Fe^{3+} , das nicht mehr reduziert wird (dies konnte bisher aufgrund der hohen benötigten Zellzahl für eine Eisenbestimmung noch nicht experimentell verifiziert werden). Eine Verminderung in der Verfügbarkeit von zweiwertigem Eisen führt zu einer Inaktivierung der Prolylhydroxylasen. Dadurch wird HIF nicht mehr abgebaut, sondern auch unter Normoxie stabilisiert. Der stark destabilisierende Effekt von H_2O_2 ist nach einem *knock down* von Cytb561 und CyAsc3 aufgehoben, was die Annahme, dass die Ferrireduktasen diesen „ROS-Effekt“ vermitteln, unterstützt.

Aufgrund unserer Ergebnisse ergibt sich folgendes Arbeitsmodell: Durch die Zugabe von ROS wird zum einen der Fe^{3+} -Gehalt in den Zellen erhöht und zum anderen werden die Ferrireduktasen aktiviert. Diese reduzieren dann in Abhängigkeit von Ascorbat das Eisen zu seiner zweiwertigen Form. Fe^{2+} aktiviert dann die Prolylhydroxylasen, die vermehrt HIF hydroxylieren und damit destabilisieren. Aus diesem Grund ist eine Inhibition der

Prolylhydroxylasen durch Zugabe eines 2-Oxoglutarat-Analogons nicht durch ROS reversibel. Eine Chelierung von zweiwertigem Eisen führt ebenfalls zu einer Inhibition der Fe^{2+} -abhängigen Prolylhydroxylasen.



Die Sauerstoffradikale könnten dabei verschiedene aktivierende Mechanismen vermitteln: Für eine direkte Aktivierung der Ferrireduktasen durch die Erhöhung des Fe^{3+} -Gehaltes sprechen die Studien von McKie, Barrow *et al.* (2001) und Turi, Wang *et al.* (2006), die eine eisenabhängige Hochregulation zeigen konnten. Darüber hinaus könnte es sich auch um eine Bereitstellung der benötigten Reduktionsäquivalente durch ROS handeln: In HBE-Zellen (*human bronchial epithelial*) wurde beispielsweise gezeigt, dass Superoxid-Anionen eine wichtige Rolle in der Eisenreduktion spielen. Die Reduktion von dreiwertigem Eisen wird in diesen Zellen durch eine Aktivierung der Superoxid-Dismutase inhibiert (Ghio, Nozik-Grayck *et al.* 2003). Auch für Dcytb im Lungenepithel wird O_2^- als Reduktionsäquivalent diskutiert (Turi, Wang *et al.* 2006). Auch eine direkte Modifikation von Enzymen durch ROS ist beschrieben: So wird die Struktur der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B durch H_2O_2 reversibel modifiziert und dadurch ihre Aktivität moduliert (Salmeen, Andersen *et al.* 2003; van Montfort, Congreve *et al.* 2003). Eine aktuelle Arbeit zeigt eine Regulation von PerR durch H_2O_2 -Gabe. H_2O_2 induziert hier die Oxidation von Histidin-Resten, wodurch die Aktivität des Transkriptionsfaktors modifiziert wird (Lee und Helmann 2006). Von den NADPH-Oxidasen produzierte ROS regulieren darüber hinaus verschiedene Phosphatasen (Meng, Fukada *et al.* 2002; Furst, Brueckl *et al.* 2005).

Ein kombinierter *Knock down* von mehreren Ferrireduktasen führte zu stark erhöhtem Zelltod in der Kultur (nicht gezeigt). Dies könnte daran liegen, dass Eisen neben der Rolle, die es bei der Hydroxylierung von HIF spielt, auch wichtig beim Elektronentransport, der Zellatmung, Proliferation und Differenzierung sowie der Regulation der Genexpression und der DNA-Synthese ist, also eine wichtige Funktion in vielen essentiellen Vorgängen in der Zelle hat. Ein Ungleichgewicht im Eisenstoffwechsel kann somit weit reichende Folgen haben. Darüber hinaus könnte eine starke Erhöhung der HIF-Aktivität durch den *knock down* aber auch zu einer Induktion von Targetgenen, die sich negativ auf das Zellwachstum auswirken, führen. So ist nach einer Stabilisierung von HIF die Induktion von Apoptose durch die Aktivierung von *p53* (Carmeliet, Dor *et al.* 1998; Metcalfe, Weeds *et al.* 1999) oder pro-apoptotischen Mitgliedern der *bcl-2*-Familie wie *BNIX* oder *BNIP-3* beschrieben (Review: Greijer und van der Wall 2004). HIF-1 α - bzw. HIF-2 α -Überexpression in Tumoren führt ebenfalls zu einer Wachstumsverlangsamung (Blancher, Moore *et al.* 2000; Acker, Diez-Juan *et al.* 2005).

Vermutlich bilden die untersuchten Enzyme ein redundantes System, um die Aufrechterhaltung des Eisenhaushaltes der Zellen sicher zu stellen. Die Regulation könnte darüber hinaus über einen Feedback-Mechanismus reguliert werden, da einige HIF-Targetgene eine Rolle im zellulären Eisenstoffwechsel spielen, wie beispielsweise Tfr1 (Lok und Ponka 1999), Transferrin und Heme Oxygenase-1 (HOX-1) (Richardson 2005). Die Inhibition des Transferrinrezeptors führt zu einer Inhibition der PHDs und damit zu einer Hochregulation von HIF in Tumorzellen. Eine Behandlung mit Ascorbat führte zu einer Reduktion von HIF in den behandelten Zellen. (Jones, Trowbridge *et al.* 2006). Auch hier könnte eine Ascorbat-vermittelte Reduktion der Ferrireduktasen eine Rolle spielen. Es gibt also mehrere vernetzte regulative Feedback-Mechanismen, die den Eisengehalt der Zellen und die Expression von HIF und HIF-Targetgenen wechselseitig kontrollieren. Auch die beobachtete Repression der Expression einiger Ferrireduktasen unter Hypoxie spricht für einen Einfluss der Regulation der HIF-Stabilität.

In der Familie der Ferrireduktasen wurde also ein neuer Regulationsmechanismus identifiziert, der von zentraler Bedeutung für die O₂-Sensorik in Zellen sein könnte und der die Verbindung herstellt zwischen dem Redox-Zustand der Zelle, der Sauerstoffradikal-vermittelten Regulation von HIF, Eisen und den Prolylhydroxylasen.

4.7 Das Tet-System in G55TL-Glioblastomzellen

HIF spielt eine wichtige Rolle bei Tumorwachstum, Progression und Metastasierung. Diese Aspekte machen HIF zu einem interessanten Ziel für die Tumorthherapie. Mittels eines induzierbaren Systems sollte in Glioblastomzellen die HIF-Expression moduliert werden und die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Expression HIF-regulierter Gene untersucht werden. Des Weiteren sollte der Einfluss auf das Zell- bzw. Tumorstadium, das durch diese Gene beeinflusst wird, analysiert werden. Dazu wurden HIF-1 α , HIF-2 α und eine HIF-dominant-negative (HIF-dn) Mutante, die sowohl beide Transaktivierungsdomänen als auch die DNA-Bindungsdomäne fehlt, in einem Tetracyclin-induzierbaren System (Tet-ON-System) in die Zellen eingebracht. Das Tet-ON-System beruht darauf, dass der Promotor erst nach Zugabe des Tetracyclin-Analogons Doxycyclin aktiviert und damit die Expression des nachfolgenden Gens induziert wird; in Abwesenheit von Doxycyclin ist der Promotor inaktiv (Gossen und Bujard 1992). Das Ziel dieser Versuche war, dass nach Doxycyclin-Gabe HIF-1 α bzw. HIF-2 α unabhängig vom umgebenden O₂-Partialdruck, d.h. auch unter normoxischen Bedingungen stabilisiert werden kann und dadurch die Expression von HIF-Targetgenen wie z.B. VEGF ansteigt. Durch die Induktion des HIF-dominant-negativen Konstrukts dagegen sollte über kompetitive Blockierung der HIF-Funktion eine reduzierte Expression von HIF-Targetgenen sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie zu beobachten sein.

Nach der Transfektion mit dem Regulator-Plasmid pTet-ON sowie den Response-Plasmiden mit den beschriebenen Konstrukten (pTREhygro-HIF) konnte in den verwendeten G55TL-Zellen eine deutliche Induzierbarkeit der Tet-regulierten Transgene erreicht werden. Diese Induktion der Transkription der Transgene nach Doxycyclin-Behandlung führte aber nicht zu einer Induktion auf Proteinebene, sondern im Gegenteil sogar zu einem Abbau von endogenem HIF auch unter Hypoxie. Die beobachtete Sensibilität der Zellen ist dosisabhängig, wie mit Hilfe von Western Blots und einem Luciferase-Reporter-Assay gezeigt werden konnte. Es konnte jedoch keine Doxycyclin-Konzentration bestimmt werden, die einerseits zu einer stabilen und ausreichend hohen Induktion der Transgen-Expression führte, andererseits aber nicht zu einem Abbau des Proteins. Die Vermutung, dass das photosensitive Doxycyclin durch Lichteinstrahlung zerfallen könnte und dabei Radikale gebildet werden könnten, so dass es sich um einen Radikal-vermittelten Abbau von HIF handeln würde, bestätigte sich ebenfalls nicht, denn eine Versuchsdurchführung in abgedunkelten Räumen führte zu keiner Veränderung der

Ergebnisse. Auch eine niedrig dosierte Zugabe des Radikalscavengers DMSO oder eine Inhibition der Prolylhydroxylasen durch Eisenchelatoren brachte keine ausreichende Verbesserung in der HIF-Stabilität mit sich.

Da das Tet-ON-System ein etabliertes und in der Literatur häufig beschriebenes System ist, ist dies wohl durch eine sehr hohe Sensitivität der von uns verwendeten Glioblastom-Linie gegenüber Doxycyclin zu erklären. Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Effekte auf die untersuchten Proteine wäre, dass Doxycyclin, ein Antibiotikum, das über eine Hemmung der Anlagerung der Aminoacyl-tRNA an die 70S-ribosomalen Untereinheit die Translation in Bakterien inhibiert (Schlegel 1992) über einen ähnlichen Mechanismus auch in eukaryotischen Zellen wirkt. Da der Translationsapparat in Eukaryonten aber über keine 70S-UE verfügt, ist dies nicht sehr wahrscheinlich. Trotzdem scheint das Antibiotikum eine Wirkung auch im eukaryotischen Organismus zu haben, da es bei verschiedenen Erkrankungen, die keine bakterielle Ursache haben, eingesetzt wird (Malaria-Prophylaxe, rheumatoide Arthritis). In der Literatur wird eine vielfältige inhibitorische Wirkung beschrieben. So ist beispielsweise eine Hemmung der MMP-Synthese und -Aktivität (Smith, Mickler *et al.* 1999; Vieillard-Baron, Frisdal *et al.* 2000; Ryan, Usman *et al.* 2001) und der IL-1-Synthese (Solomon, Rosenblatt *et al.* 2000), eine Inhibition der aktivierten T-Zell-Funktion (Kuzin, Snyder *et al.* 2001) und der NO-Synthese durch Makrophagen (Amin, Patel *et al.* 1997) bekannt. Der genaue Wirkmechanismus ist bisher nicht beschrieben. Da jedoch die bakteriellen Ribosomen im Aufbau denen der eukaryoten Mitochondrien ähneln, könnte dies ein möglicher Wirkungsort sein.

Interessanterweise wirkt Doxycyclin häufig in einem Kontext inhibitorisch, in dem auch Hypoxie und HIF eine Rolle spielen: Rheumatoide Arthritis, eine Erkrankung zu deren Behandlung Doxycyclin eingesetzt wird, geht mit hypoxischen Zuständen im Gewebe einher. Auch einige der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind hypoxieregulierbar oder sogar als HIF-Targetgene beschrieben (Petrella, Lohi *et al.* 2005). Hier könnte es also einen Zusammenhang geben. Der molekulare Mechanismus ist jedoch ungeklärt.

Eine mögliche Alternative, um die geplanten Untersuchungen zur Rolle von HIF-Targetgenen und zum Tumorwachstum weiterführen zu können, ist die Etablierung eines Tet-OFF-Systems, d.h. eines Systems, in dem die Transgene durch Weglassen von Doxycyclin induziert werden. Hier würde die beobachtete hemmende Wirkung also den gewünschten Effekt sogar noch verstärken. In den letzten Monaten wurde begonnen, in die

beschriebenen Zelllinien mit einem Tet-OFF-Regulator-Plasmid stabil zu transfizieren und die Klone zu testen, um mit Hilfe dieses Systems unsere Untersuchungen fortführen zu können. Die bisher analysierten Tet-OFF-pTREhygro-HIF-1 α -Klone zeigen eine hohe und stabile Expression des Transgens sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene und sind somit gut geeignet, um mit ihnen weiter zu arbeiten.

5 Zusammenfassung

Hypoxie entsteht, wenn das Sauerstoffangebot bzw. die Sauerstoffversorgung unter ein Niveau sinkt, das benötigt wird, um physiologische O₂-Drücke des betreffenden Gewebes aufrecht zu erhalten. Sinkt der Sauerstoff-Partialdruck, so werden adaptive Mechanismen aktiviert. Neben der Anpassung durch das kardiovaskuläre System werden auch verschiedene Gene aktiviert. Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass Hypoxie-induzierte Genexpression insbesondere von zwei Transkriptionsfaktoren, HIF (*hypoxia inducible factor*) -1 α und -2 α , gesteuert wird. Man kennt über 70 Gene, die von HIF transaktiviert werden. Dabei handelt es sich um Modulatoren von Angiogenese und Vasodilatation, Erythropoese sowie der Umstellung des Stoffwechsels von oxidativer Phosphorylierung auf Glykolyse.

Die Hypoxie-induzierbare Genexpression wird sowohl über eine Steigerung der Transaktivierungsaktivität als auch der Proteinmenge der HIF- α -Untereinheiten reguliert. Die Regulation der HIF-Proteinmenge erfolgt über eine vom O₂-Partialdruck abhängige Stabilisierung der α -Untereinheit des Proteins. Unter normoxischen Bedingungen wird das Protein durch die Prolylhydroxylasen (PHD) O₂-abhängig hydroxyliert, pVHL-vermittelt (VHL = von Hippel-Lindau), ubiquitiniert und proteosomal abgebaut. Unter hypoxischen Bedingungen dagegen wird das Protein stabilisiert, akkumuliert im Zellkern und bindet an eine spezifische Zielsequenz, das Hypoxia-responsive element oder HRE, im Promotor von Hypoxie-aktivierten Genen.

Die PHDs gehören zu einer Familie von Eisen- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen. Neben diesen Faktoren wird eine Regulation von HIF durch Sauerstoffradikale (ROS, *reactive oxygen species*) in der Literatur sehr kontrovers diskutiert, da die Wirkung von ROS auf HIF sich unter Normoxie, Hypoxie oder dem Einfluss von Wachstumsfaktoren unterscheidet. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Frage, welche Rolle die PHDs bei der ROS-vermittelten HIF-Regulation spielen, beantwortet werden. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde anhand von Glioblastom-Zelllinien untersucht. Die vorliegende Arbeit zeigt eine Stabilisierung von HIF nach Verringerung der ROS-Konzentration unter Normoxie. Eine Erhöhung der ROS-Konzentration führt dagegen zu einer dosisabhängigen Verminderung von HIF und der HIF-Targetgen-Expression. Es konnte eine direkte Abhängigkeit der Destabilisierung von VHL und den Prolylhydroxylasen gezeigt werden, da sowohl eine VHL-Defizienz als auch eine Mutation der Prolylreste oder eine Inhibition der PHDs zu einer Aufhebung des Effekts führen. Eine

vergleichbare destabilisierende Wirkung auf HIF übt Ascorbat aus. Überraschenderweise führt sowohl die Zugabe von H_2O_2 mit seiner oxidativen Wirkung als auch die Zugabe des Reduktionsmittels Ascorbat zu einer Erhöhung des intrazellulären Fe^{2+} -Gehaltes. Dieser Befund kann durch eine Aktivierung von Enzymen mit eisenreduzierenden Eigenschaften erklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Proteinfamilie der Ferrireduktasen (FR) identifiziert und fünf Enzyme, die eine Homologie zur cytb561-Domäne aufweisen, kloniert. Eine detaillierte Charakterisierung zeigte, dass die Enzyme tatsächlich eine eisenreduzierende Aktivität aufweisen, die durch die exogene Zugabe von ROS noch erhöht wird. Eine Überexpression der FR führt zu einem erhöhten Abbau von HIF. Ein knock down mittels siRNA führt dagegen zu einer Akkumulation von HIF und die destabilisierende Wirkung von ROS ist nach einem knock down der FR deutlich reduziert.

Aufgrund der in dieser Doktorarbeit gezeigten Daten kann folgendes Modell aufgestellt werden: Die primäre oxidative Wirkung von ROS führt vermutlich zu einer Aktivierung der Ferrireduktasen, die in Abhängigkeit von Ascorbat dann vermehrt Eisen reduzieren, so dass dies den PHDs als Substrat zur Verfügung steht. Der regulierende Einfluss auf HIF wird somit vermutlich über eine erhöhte Aktivität der Prolylhydroxylasen durch eine Erhöhung des intrazellulären Fe^{2+} -Gehaltes vermittelt. Die erhobenen Daten deuten an, dass die Familie der Ferrireduktasen ein zentrales Bindeglied im O_2 -Sensing darstellt, das in Abhängigkeit von Redox-Signalen homeostatische Antworten auf Hypoxie moduliert.

6 Literaturverzeichnis

- Acker, T. and H. Acker (2004). "Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications." *J Exp Biol* **207**(Pt 18): 3171-88.
- Acker, T., A. Diez-Juan, et al. (2005). "Genetic evidence for a tumor suppressor role of HIF-2alpha." *Cancer Cell* **8**(2): 131-41.
- Acker, T. and K. H. Plate (2002). "A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology." *J Mol Med* **80**(9): 562-75.
- Amin, A. R., R. N. Patel, et al. (1997). "Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA in murine macrophages by doxycycline and chemically modified tetracyclines." *FEBS Lett* **410**(2-3): 259-64.
- An, W. G., M. Kanekal, et al. (1998). "Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha." *Nature* **392**(6674): 405-8.
- Aprelikova, O., G. V. Chandramouli, et al. (2004). "Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors." *J Cell Biochem* **92**(3): 491-501.
- Bashtovyy, D., A. Berczi, et al. (2003). "Structure prediction for the di-heme cytochrome b561 protein family." *Protoplasma* **221**(1-2): 31-40.
- BelAiba, R. S., T. Djordjevic, et al. (2004). "Redox-sensitive regulation of the HIF pathway under non-hypoxic conditions in pulmonary artery smooth muscle cells." *Biol Chem* **385**(3-4): 249-57.
- Berczi A, S. D., Lakshminarasimhan M, Vargas A, Asard H. (2005). "Heterologous expression and site-directed mutagenesis of an ascorbate-reducible cytochrome b561." *Arch Biochem Biophys* **12**(23): 2683-2693.
- Berra, E., E. Benizri, et al. (2003). "HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia." *Embo J* **22**(16): 4082-90.
- Berra, E., A. Ginouves, et al. (2006). "The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling." *EMBO Rep* **7**(1): 41-5.
- Berra, E., J. Milanini, et al. (2000). "Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia." *Biochem Pharmacol* **60**(8): 1171-8.
- Berra, E., D. E. Richard, et al. (2001). "HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1alpha degradation." *FEBS Lett* **491**(1-2): 85-90.
- Bilton, R., N. Mazure, et al. (2005). "Arrest-defective-1 protein, an acetyltransferase, does not alter stability of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and is not induced by hypoxia or HIF." *J Biol Chem* **280**(35): 31132-40.

- Blagosklonny, M. V. (2001). "Do VHL and HIF-1 mirror p53 and Mdm-2? Degradation-transactivation loops of oncoproteins and tumor suppressors." *Oncogene* **20**(3): 395-8.
- Blancher, C., J. W. Moore, et al. (2000). "Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines." *Cancer Res* **60**(24): 7106-13.
- Brizel, D. M., S. P. Scully, et al. (1996). "Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma." *Cancer Res* **56**(5): 941-3.
- Brown, J. M. and A. J. Giaccia (1998). "The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy." *Cancer Res* **58**(7): 1408-16.
- Bruick, R. K. and S. L. McKnight (2001). "A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF." *Science* **294**(5545): 1337-40.
- Brune, B. and J. Zhou (2003). "The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha)." *Curr Med Chem* **10**(10): 845-55.
- Bustin, S. A., V. Benes, et al. (2005). "Quantitative real-time RT-PCR--a perspective." *J Mol Endocrinol* **34**(3): 597-601.
- Callapina, M., J. Zhou, et al. (2005). "NO restores HIF-1alpha hydroxylation during hypoxia: role of reactive oxygen species." *Free Radic Biol Med* **39**(7): 925-36.
- Callapina, M., J. Zhou, et al. (2005). "Nitric oxide reverses desferrioxamine- and hypoxia-evoked HIF-1alpha accumulation--implications for prolyl hydroxylase activity and iron." *Exp Cell Res* **306**(1): 274-84.
- Carmeliet, P., Y. Dor, et al. (1998). "Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis." *Nature* **394**(6692): 485-90.
- Chan, D. A., P. D. Sutphin, et al. (2005). "Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha." *Mol Cell Biol* **25**(15): 6415-26.
- Chandel, N. S., E. Maltepe, et al. (1998). "Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(20): 11715-20.
- Chandel, N. S., D. S. McClintock, et al. (2000). "Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing." *J Biol Chem* **275**(33): 25130-8.
- Chen, C., N. Pore, et al. (2001). "Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia." *J Biol Chem* **276**(12): 9519-25.
- Chow, L. S., K. W. Lo, et al. (2004). "RASSF1A is a target tumor suppressor from 3p21.3 in nasopharyngeal carcinoma." *Int J Cancer* **109**(6): 839-47.

- Cockman, M. E., N. Masson, et al. (2000). "Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein." J Biol Chem **275**(33): 25733-41.
- Cohen, G., P. M. Sinet, et al. (1980). "Ethanol oxidation by rat brain in vivo." Alcohol Clin Exp Res **4**(4): 366-70.
- Dancis, A., D. G. Roman, et al. (1992). "Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(9): 3869-73.
- Davies, K. J. (1999). "The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress." IUBMB Life **48**(1): 41-7.
- de Jong, L., S. P. Albracht, et al. (1982). "Prolyl 4-hydroxylase activity in relation to the oxidation state of enzyme-bound iron. The role of ascorbate in peptidyl proline hydroxylation." Biochim Biophys Acta **704**(2): 326-32.
- del Peso, L., M. C. Castellanos, et al. (2003). "The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen." J Biol Chem **278**(49): 48690-5.
- Diserens, A. C., N. de Tribolet, et al. (1981). "Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18." Acta Neuropathol (Berl) **53**(1): 21-8.
- Doege, K., S. Heine, et al. (2005). "Inhibition of mitochondrial respiration elevates oxygen concentration but leaves regulation of hypoxia-inducible factor (HIF) intact." Blood **106**(7): 2311-7.
- Dusting, G. J., S. Selemidis, et al. (2005). "Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall." Mem Inst Oswaldo Cruz **100 Suppl 1**: 97-103.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, et al. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature **411**(6836): 494-8.
- Elson, D. A., H. E. Ryan, et al. (2000). "Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1 α and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing." Cancer Res **60**(21): 6189-95.
- Elvert, G., A. Kappel, et al. (2003). "Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1)." J Biol Chem **278**(9): 7520-30.
- Enomoto, N., N. Koshikawa, et al. (2002). "Hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-1 α and oxygen-regulated gene expression in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells." Biochem Biophys Res Commun **297**(2): 346-52.
- Epstein, A. C., J. M. Gleadle, et al. (2001). "C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation." Cell **107**(1): 43-54.

- Fandrey, J., S. Frede, et al. (1997). "Cobalt chloride and desferrioxamine antagonize the inhibition of erythropoietin production by reactive oxygen species." Kidney Int **51**(2): 492-6.
- Fandrey, J., S. Frede, et al. (1994). "Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production." Biochem J **303** (Pt 2): 507-10.
- Feldser, D., F. Agani, et al. (1999). "Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2." Cancer Res **59**(16): 3915-8.
- Flatmark, T. and O. Terland (1971). "Cytochrome b 561 of the bovine adrenal chromaffin granules. A high potential b-type cytochrome." Biochim Biophys Acta **253**(2): 487-91.
- Forsythe, J. A., B. H. Jiang, et al. (1996). "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1." Mol Cell Biol **16**(9): 4604-13.
- Freedman, S. J., Z. Y. Sun, et al. (2002). "Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5367-72.
- Furst, R., C. Brueckl, et al. (2005). "Atrial natriuretic peptide induces mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in human endothelial cells via Rac1 and NAD(P)H oxidase/Nox2-activation." Circ Res **96**(1): 43-53.
- Geiszt, M., J. B. Kopp, et al. (2000). "Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 8010-4.
- Genius, J. and J. Fandrey (2000). "Nitric oxide affects the production of reactive oxygen species in hepatoma cells: implications for the process of oxygen sensing." Free Radic Biol Med **29**(6): 515-21.
- Gerald, D., E. Berra, et al. (2004). "JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress." Cell **118**(6): 781-94.
- Ghio, A. J., E. Nozik-Grayck, et al. (2003). "Superoxide-dependent iron uptake: a new role for anion exchange protein 2." Am J Respir Cell Mol Biol **29**(6): 653-60.
- Gleadle, J. M. and P. J. Ratcliffe (1998). "Hypoxia and the regulation of gene expression." Mol Med Today **4**(3): 122-9.
- Gohmann, A. (1998). Oxidation Stress in Skeletal Muscle. Basel-Boston-Berlin, Birkhauser Verlag.
- Gorlach, A., U. Berchner-Pfannschmidt, et al. (2003). "Reactive oxygen species modulate HIF-1 mediated PAI-1 expression: involvement of the GTPase Rac1." Thromb Haemost **89**(5): 926-35.
- Gorlach, A., I. Diebold, et al. (2001). "Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase." Circ Res **89**(1): 47-54.

- Gossen, M. and H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5547-51.
- Goyal, P., N. Weissmann, et al. (2004). "Upregulation of NAD(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species." Free Radic Biol Med **36**(10): 1279-88.
- Graeber, T. G., C. Osmanian, et al. (1996). "Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours." Nature **379**(6560): 88-91.
- Greijer, A. E. and E. van der Wall (2004). "The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis." J Clin Pathol **57**(10): 1009-14.
- Griguer, C. E., C. R. Oliva, et al. (2006). "Xanthine oxidase-dependent regulation of hypoxia-inducible factor in cancer cells." Cancer Res **66**(4): 2257-63.
- Guillemin, K. and M. A. Krasnow (1997). "The hypoxic response: huffing and HIFing." Cell **89**(1): 9-12.
- Gupte, S. A., P. M. Kaminski, et al. (2005). "Cytosolic NADPH may regulate differences in basal Nox oxidase-derived superoxide generation in bovine coronary and pulmonary arteries." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(1): H13-21.
- Guzy, R. D., B. Hoyos, et al. (2005). "Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing." Cell Metab **1**(6): 401-8.
- Haddad, J. J. and S. C. Land (2001). "A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependent regulation of HIF-1alpha." FEBS Lett **505**(2): 269-74.
- Hagen, T., G. D'Amico, et al. (2004). "Inhibition of mitochondrial respiration by the anticancer agent 2-methoxyestradiol." Biochem Biophys Res Commun **322**(3): 923-9.
- Hagen, T., C. T. Taylor, et al. (2003). "Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha." Science **302**(5652): 1975-8.
- Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-64.
- Hara, S., J. Hamada, et al. (2001). "Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha." Biochem Biophys Res Commun **287**(4): 808-13.
- Hirsila, M., P. Koivunen, et al. (2003). "Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor." J Biol Chem **278**(33): 30772-80.
- Hockel, M. and P. Vaupel (2001). "Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects." J Natl Cancer Inst **93**(4): 266-76.
- Hon, W. C., M. I. Wilson, et al. (2002). "Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL." Nature **417**(6892): 975-8.

- Horwitz, L. D. and N. A. Sherman (2001). "Bucillamine prevents myocardial reperfusion injury." J Cardiovasc Pharmacol **38**(6): 859-67.
- Hu, C. J., L. Y. Wang, et al. (2003). "Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation." Mol Cell Biol **23**(24): 9361-74.
- Huang, J., Q. Zhao, et al. (2002). "Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3." J Biol Chem **277**(42): 39792-800.
- Huang, L. E., Z. Arany, et al. (1996). "Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit." J Biol Chem **271**(50): 32253-9.
- Huang, L. E., W. G. Willmore, et al. (1999). "Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling." J Biol Chem **274**(13): 9038-44.
- Imagawa, S., M. A. Goldberg, et al. (1991). "Regulatory elements of the erythropoietin gene." Blood **77**(2): 278-85.
- Ivan, M., K. Kondo, et al. (2001). "HIF1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing." Science **292**(5516): 464-8.
- Jaakkola, P., D. R. Mole, et al. (2001). "Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation." Science **292**(5516): 468-72.
- Jeong, J. W., M. K. Bae, et al. (2002). "Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation." Cell **111**(5): 709-20.
- Jiang, B. H., F. Agani, et al. (1997). "V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression." Cancer Res **57**(23): 5328-35.
- Jiang, B. H., E. Rue, et al. (1996). "Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1." J Biol Chem **271**(30): 17771-8.
- Jiang, F. and G. J. Dusting (2003). "Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: potential role of their antiinflammatory effects." Curr Vasc Pharmacol **1**(2): 135-56.
- Jones, D. T., I. S. Trowbridge, et al. (2006). "Effects of transferrin receptor blockade on cancer cell proliferation and hypoxia-inducible factor function and their differential regulation by ascorbate." Cancer Res **66**(5): 2749-56.
- Kamata, H. and H. Hirata (1999). "Redox regulation of cellular signalling." Cell Signal **11**(1): 1-14.

- Kasuno, K., S. Takabuchi, et al. (2004). "Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling." J Biol Chem **279**(4): 2550-8.
- Kelley, E. E., T. Hock, et al. (2006). "Moderate hypoxia induces xanthine oxidoreductase activity in arterial endothelial cells." Free Radic Biol Med **40**(6): 952-9.
- Kietzmann, T., J. Fandrey, et al. (2000). "Oxygen Radicals as Messengers in Oxygen-Dependent Gene Expression." News Physiol Sci **15**: 202-208.
- Kim, J. W., I. Tchernyshyov, et al. (2006). "HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia." Cell Metab **3**(3): 177-85.
- Kim, W. and W. G. Kaelin, Jr. (2003). "The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer." Curr Opin Genet Dev **13**(1): 55-60.
- Kimura, H., A. Weisz, et al. (2000). "Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide." Blood **95**(1): 189-97.
- Kivirikko, K. I. and J. Myllyharju (1998). "Prolyl 4-hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit." Matrix Biol **16**(7): 357-68.
- Knowles, H. J., R. R. Raval, et al. (2003). "Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells." Cancer Res **63**(8): 1764-8.
- Kozak, M. (1987). "At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells." J Mol Biol **196**(4): 947-50.
- Krieg, M., R. Haas, et al. (2000). "Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function." Oncogene **19**(48): 5435-43.
- Kuzin, II, J. E. Snyder, et al. (2001). "Tetracyclines inhibit activated B cell function." Int Immunol **13**(7): 921-31.
- Lando, D., D. J. Peet, et al. (2002). "FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor." Genes Dev **16**(12): 1466-71.
- Lando, D., D. J. Peet, et al. (2002). "Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch." Science **295**(5556): 858-61.
- Latunde-Dada, G. O., J. Van der Westhuizen, et al. (2002). "Molecular and functional roles of duodenal cytochrome B (Dcytb) in iron metabolism." Blood Cells Mol Dis **29**(3): 356-60.
- Lee, I., E. Bender, et al. (2001). "New control of mitochondrial membrane potential and ROS formation--a hypothesis." Biol Chem **382**(12): 1629-36.
- Lee, J. W. and J. D. Helmann (2006). "The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation." Nature **440**(7082): 363-7.

- Leniger-Follert, E., D. W. Lubbers, et al. (1975). "Regulation of local tissue PO₂ of the brain cortex at different arterial O₂ pressures." Pflügers Arch **359**(1-2): 81-95.
- Lerman, M. I. and J. D. Minna (2000). "The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium." Cancer Res **60**(21): 6116-33.
- Li, C. and R. M. Jackson (2002). "Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury." Am J Physiol Cell Physiol **282**(2): C227-41.
- Li, Y. and M. A. Trush (1998). "Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production." Biochem Biophys Res Commun **253**(2): 295-9.
- Liu, Q., U. Berchner-Pfannschmidt, et al. (2004). "A Fenton reaction at the endoplasmic reticulum is involved in the redox control of hypoxia-inducible gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4302-7.
- Liu, Y., H. Christou, et al. (1998). "Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5' enhancer." J Biol Chem **273**(24): 15257-62.
- Lok, C. N. and P. Ponka (1999). "Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene." J Biol Chem **274**(34): 24147-52.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.
- Ludwiczek, S., I. Theurl, et al. (2005). "Regulatory networks for the control of body iron homeostasis and their dysregulation in HFE mediated hemochromatosis." J Cell Physiol **204**(2): 489-99.
- Mansfield, K. D., R. D. Guzy, et al. (2005). "Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation." Cell Metab **1**(6): 393-9.
- Maranchie, J. K. and Y. Zhan (2005). "Nox4 is critical for hypoxia-inducible factor 2- α transcriptional activity in von Hippel-Lindau-deficient renal cell carcinoma." Cancer Res **65**(20): 9190-3.
- Margoliash, E., A. Novogrodsky, et al. (1960). "Irreversible reaction of 3-amino-1:2:4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase." Biochem J **74**: 339-48.
- Marxsen, J. H., P. Stengel, et al. (2004). "Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF- α -prolyl-4-hydroxylases." Biochem J **381**(Pt 3): 761-7.
- Mateo, J., M. Garcia-Lecea, et al. (2003). "Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways." Biochem J **376**(Pt 2): 537-44.

- Maxwell, P. H., G. U. Dachs, et al. (1997). "Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(15): 8104-9.
- Maxwell, P. H., M. S. Wiesener, et al. (1999). "The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis." Nature **399**(6733): 271-5.
- McKie, A. T., D. Barrow, et al. (2001). "An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron." Science **291**(5509): 1755-9.
- McKie, A. T., G. O. Latunde-Dada, et al. (2002). "Molecular evidence for the role of a ferric reductase in iron transport." Biochem Soc Trans **30**(4): 722-4.
- Meng, T. C., T. Fukada, et al. (2002). "Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo." Mol Cell **9**(2): 387-99.
- Metcalfe, S., A. Weeds, et al. (1999). "Wild-type p53 protein shows calcium-dependent binding to F-actin." Oncogene **18**(14): 2351-5.
- Metzen, E., U. Berchner-Pfannschmidt, et al. (2003). "Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing." J Cell Sci **116**(Pt 7): 1319-26.
- Metzen, E., J. Zhou, et al. (2003). "Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases." Mol Biol Cell **14**(8): 3470-81.
- Min, J. H., H. Yang, et al. (2002). "Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling." Science **296**(5574): 1886-9.
- Moeller, B. J., M. R. Dreher, et al. (2005). "Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity." Cancer Cell **8**(2): 99-110.
- Mohazzab, K. M. and M. S. Wolin (2000). "Oxidant signalling and vascular oxygen sensing. Role of H₂O₂ in responses of the bovine pulmonary artery to changes in PO₂." Adv Exp Med Biol **475**: 249-58.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.
- Nakayama, K., I. J. Frew, et al. (2004). "Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia." Cell **117**(7): 941-52.
- Neusser, M. (2001). "Schnelles Verfahren der PCR-Optimierung mit "Real-Time"-PCR." BioSpektrum **7**(6).
- O'Donnell, B., DGTew, OT Jones, PJ England (1993). "Studies on the inhibitory mechanisms of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase." Biochem J **290**: 41-49.

- Oehme, F., P. Ellinghaus, et al. (2002). "Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors." Biochem Biophys Res Commun **296**(2): 343-9.
- Ohgami, R. S., D. R. Campagna, et al. (2005). "Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells." Nat Genet **37**(11): 1264-9.
- Page, E. L., G. A. Robitaille, et al. (2002). "Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms." J Biol Chem **277**(50): 48403-9.
- Pages, G. and J. Pouyssegur (2005). "Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors." Cardiovasc Res **65**(3): 564-73.
- Papandreou, I., R. A. Cairns, et al. (2006). "HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption." Cell Metab **3**(3): 187-97.
- Pearse, D. B. and J. M. Dodd (1999). "Ischemia-reperfusion lung injury is prevented by apocynin, a novel inhibitor of leukocyte NADPH oxidase." Chest **116**(1 Suppl): 55S-56S.
- Petrella, B. L., J. Lohi, et al. (2005). "Identification of membrane type-1 matrix metalloproteinase as a target of hypoxia-inducible factor-2 alpha in von Hippel-Lindau renal cell carcinoma." Oncogene **24**(6): 1043-52.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Ponten, J. and E. H. Macintyre (1968). "Long term culture of normal and neoplastic human glia." Acta Pathol Microbiol Scand **74**(4): 465-86.
- Ponting, C. P. (2001). "Domain homologues of dopamine beta-hydroxylase and ferric reductase: roles for iron metabolism in neurodegenerative disorders?" Hum Mol Genet **10**(17): 1853-8.
- Reinheckel, T., N. Sitte, et al. (1998). "Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress." Biochem J **335** (Pt 3): 637-42.
- Reinheckel, T., O. Ullrich, et al. (2000). "Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress." Arch Biochem Biophys **377**(1): 65-8.
- Richard, D. E., E. Berra, et al. (2000). "Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **275**(35): 26765-71.
- Richardson, D. R. (2005). "Molecular mechanisms of iron uptake by cells and the use of iron chelators for the treatment of cancer." Curr Med Chem **12**(23): 2711-29.
- Robinson, N. J., C. M. Procter, et al. (1999). "A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils." Nature **397**(6721): 694-7.

- Ryan, H. E., M. Poloni, et al. (2000). "Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth." Cancer Res **60**(15): 4010-5.
- Ryan, M. E., A. Usman, et al. (2001). "Excessive matrix metalloproteinase activity in diabetes: inhibition by tetracycline analogues with zinc reactivity." Curr Med Chem **8**(3): 305-16.
- Salceda, S., I. Beck, et al. (1996). "Absolute requirement of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein for gene activation by hypoxia." Arch Biochem Biophys **334**(2): 389-94.
- Salceda, S. and J. Caro (1997). "Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes." J Biol Chem **272**(36): 22642-7.
- Salmeen, A., J. N. Andersen, et al. (2003). "Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate." Nature **423**(6941): 769-73.
- Sambrook, T. P. M. E. F. F. J. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandau, K. B., J. Fandrey, et al. (2001). "Accumulation of HIF-1alpha under the influence of nitric oxide." Blood **97**(4): 1009-15.
- Sandau, K. B., J. Zhou, et al. (2001). "Regulation of the hypoxia-inducible factor 1alpha by the inflammatory mediators nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in contrast to desferroxamine and phenylarsine oxide." J Biol Chem **276**(43): 39805-11.
- Schlegel, H. G. (1992). Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart, New York, Thieme Verlag.
- Schoenfeld, A. R., E. J. Davidowitz, et al. (2001). "Endoplasmic reticulum/cytosolic localization of von Hippel-Lindau gene products is mediated by a 64-amino acid region." Int J Cancer **91**(4): 457-67.
- Schofield, C. J. and Z. Zhang (1999). "Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes." Curr Opin Struct Biol **9**(6): 722-31.
- Schroedl, C., D. S. McClintock, et al. (2002). "Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(5): L922-31.
- Searle, G. J., M. E. Hartness, et al. (2002). "Lack of contribution of mitochondrial electron transport to acute O(2) sensing in model airway chemoreceptors." Biochem Biophys Res Commun **291**(2): 332-7.
- Semenza, G. L. (1999). "Regulation of mammalian O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 551-78.
- Shirozu, M., H. Tada, et al. (1996). "Characterization of novel secreted and membrane proteins isolated by the signal sequence trap method." Genomics **37**(3): 273-80.

- Smith, G. N., Jr., E. A. Mickler, et al. (1999). "Specificity of inhibition of matrix metalloproteinase activity by doxycycline: relationship to structure of the enzyme." Arthritis Rheum **42**(6): 1140-6.
- Sogawa, K., K. Numayama-Tsuruta, et al. (1998). "Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7368-73.
- Solomon, A., M. Rosenblatt, et al. (2000). "Doxycycline inhibition of interleukin-1 in the corneal epithelium." Am J Ophthalmol **130**(5): 688.
- Sowter, H. M., P. J. Ratcliffe, et al. (2001). "HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors." Cancer Res **61**(18): 6669-73.
- Sowter, H. M., R. R. Raval, et al. (2003). "Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1alpha versus Hif-2alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia." Cancer Res **63**(19): 6130-4.
- Srinivas, V., I. Leshchinsky, et al. (2001). "Oxygen sensing and HIF-1 activation does not require an active mitochondrial respiratory chain electron-transfer pathway." J Biol Chem **276**(25): 21995-8.
- Srinivas, V., X. Zhu, et al. (1999). "Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) is a non-heme iron protein. Implications for oxygen sensing." J Biol Chem **274**(2): 1180.
- Srivastava, M. (1995). "Genomic structure and expression of the human gene encoding cytochrome b561, an integral protein of the chromaffin granule membrane." J Biol Chem **270**(39): 22714-20.
- Srivastava, M., L. T. Duong, et al. (1984). "Cytochrome b561 catalyzes transmembrane electron transfer." J Biol Chem **259**(13): 8072-5.
- Staller, P., J. Sulitkova, et al. (2003). "Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL." Nature **425**(6955): 307-11.
- Stolk, J., T. J. Hiltermann, et al. (1994). "Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol." Am J Respir Cell Mol Biol **11**(1): 95-102.
- Tian, H., S. L. McKnight, et al. (1997). "Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells." Genes Dev **11**(1): 72-82.
- Trowbridge, I. S. and D. A. Shackelford (1986). "Structure and function of transferrin receptors and their relationship to cell growth." Biochem Soc Symp **51**: 117-29.
- Tsubaki, M., F. Takeuchi, et al. (2005). "Cytochrome b561 protein family: expanding roles and versatile transmembrane electron transfer abilities as predicted by a new classification system and protein sequence motif analyses." Biochim Biophys Acta **1753**(2): 174-90.

- Tuckerman, J. R., Y. Zhao, et al. (2004). "Determination and comparison of specific activity of the HIF-prolyl hydroxylases." *FEBS Lett* **576**(1-2): 145-50.
- Turi, J. L., X. Wang, et al. (2006). "Duodenal Cytochrome b: a Novel Ferri-reductase in Airway Epithelial Cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.
- Unruh, A., A. Ressel, et al. (2003). "The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy." *Oncogene* **22**(21): 3213-20.
- van Montfort, R. L., M. Congreve, et al. (2003). "Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B." *Nature* **423**(6941): 773-7.
- Vargas, J. D., B. Herpers, et al. (2003). "Stromal cell-derived receptor 2 and cytochrome b561 are functional ferric reductases." *Biochim Biophys Acta* **1651**(1-2): 116-23.
- Vaupel, P., F. Kallinowski, et al. (1989). "Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review." *Cancer Res* **49**(23): 6449-65.
- Vaux, E. C., E. Metzen, et al. (2001). "Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain." *Blood* **98**(2): 296-302.
- Vieillard-Baron, A., E. Frisdal, et al. (2000). "Inhibition of matrix metalloproteinases by lung TIMP-1 gene transfer or doxycycline aggravates pulmonary hypertension in rats." *Circ Res* **87**(5): 418-25.
- Wang, G. L. and G. L. Semenza (1995). "Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1." *J Biol Chem* **270**(3): 1230-7.
- Wartenberg, M., S. Gronczynska, et al. (2005). "Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular prostate tumor spheroids by hyperthermia and reactive oxygen species." *Int J Cancer* **113**(2): 229-40.
- Wartenberg, M., E. Hoffmann, et al. (2005). "Reactive oxygen species-linked regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in Nox-1 overexpressing prostate tumor spheroids." *FEBS Lett* **579**(20): 4541-4549.
- Wartenberg, M., F. C. Ling, et al. (2003). "Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species." *Faseb J* **17**(3): 503-5.
- Wellman, T. L., J. Jenkins, et al. (2004). "Nitric oxide and reactive oxygen species exert opposing effects on the stability of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in explants of human pial arteries." *Faseb J* **18**(2): 379-81.
- White, C. W. (2006). "Commentary on "Hypoxia, hypoxic signaling, tissue damage, and detection of reactive oxygen species (ROS)"." *Free Radic Biol Med* **40**(6): 923-7.
- Wiesener, M. S., M. Seyfarth, et al. (2002). "Paraneoplastic erythrocytosis associated with an inactivating point mutation of the von Hippel-Lindau gene in a renal cell carcinoma." *Blood* **99**(10): 3562-5.

- Wiesener, M. S., H. Turley, et al. (1998). "Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha." Blood **92**(7): 2260-8.
- Wolin, M. S., M. Ahmad, et al. (2005). "Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms: basic concepts, current controversies, and potential importance of cytosolic NADPH." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **289**(2): L159-73.
- Yang, Z. Z., A. Y. Zhang, et al. (2003). "Redox regulation of HIF-1alpha levels and HO-1 expression in renal medullary interstitial cells." Am J Physiol Renal Physiol **284**(6): F1207-15.
- Zelzer, E., Y. Levy, et al. (1998). "Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT." Embo J **17**(17): 5085-94.
- Zhong, H., K. Chiles, et al. (2000). "Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics." Cancer Res **60**(6): 1541-5.
- Zhong, H., A. M. De Marzo, et al. (1999). "Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases." Cancer Res **59**(22): 5830-5.
- Zundel, W., C. Schindler, et al. (2000). "Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression." Genes Dev **14**(4): 391-6.

7 Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ARD	Arrest-defective 1 Protein
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
CyAsc3	Ascorbat-abhängiges Cytochrom 3
bp	Basenpaare
bHLH	<i>basic helix loop helix</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CA IX	<i>Carbonic Anhydrase IX</i>
Cytb561	Cytochrom b561
Cytb561D1	<i>Cytochrome b561 domain 1</i>
Cytb561D2	<i>Cytochrome b561 domain 2</i>
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DFO	Deferoxamine
DNA	<i>Desoxynucleic Acid</i>
dNTP	Desoxytrinukleotidphoshat
DMOG	Dimethyloxalylglycin
DPI	Diphenyleneiodonium
DP	Dipyridyl
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
Dcytb	duodenale Cytochrom b Reduktase
ETC	<i>electron transport chain</i> = Elektronentransportkette
EPO	Erythropoetin
FIH	<i>factor inhibiting HIF</i>
FR	Ferrireduktase
FCS	<i>fetal calf serum</i> = fötales Kälberserum
GLUT-1	<i>Glucose-Transporter-1</i>
HPRT	<i>Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase</i>
HRE	<i>hypoxia responsive element</i>
HIF	<i>Hypoxia-inducible Factor</i>
kb	kiloBasenpaare

kDa	kiloDalton
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NMPG	N-(2-Mercaptopropionyl)glycin
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>
ODD	<i>oxygen dependent degradation</i>
PAS	PER, ARNT und SIM
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PI3K	Phosphatidylinositriphosphat
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = Polymerasekettenreaktion
PHD	Prolyl-4-hydroxylase
ROS	<i>reactive oxygen species</i> = reaktive Sauerstoffradikale
RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
TRE	<i>Tet responsive element</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamine
TAD	Transaktivierungsdomäne
tRNA	<i>transfer Ribonucleic acid</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VHL	von Hippel-Lindau-Faktor

Schlussbemerkung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Edinger Institut, dem Neurologischen Institut des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe Universität. An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Menschen bedanken, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Karl-Heinz Plate, Direktor des Edinger Instituts, für die wissenschaftliche Betreuung und für die weit darüber hinaus gehende Unterstützung während meiner Arbeit. Meiner Doktormutter Frau Prof. Anna Starzinski-Powitz möchte ich für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre Gutachter-Tätigkeit danken. Herrn Prof. Herbert Zimmermann und Herrn Prof. Bernhard Brüne danke ich herzlich, dass sie sich als Prüfer zur Verfügung gestellt haben. Herrn Dr. med. Till Acker möchte ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Betreuung sowie die wertvollen Anregungen beim Schreiben meiner Arbeit danken.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes sowie der Ludwig-Edinger-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Ein herzliches Dankeschön geht an die ehemaligen und jetzigen Mitglieder der Arbeitsgruppe Acker: An alle und im Allgemeinen für die gute Stimmung, die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung in jeder Hinsicht.

Im Besonderen aber auch:

An meine "Weggefährtin" und Mitdoktorandin Johanna Riedel für das Miteinander, die fachliche Unterstützung und so manche Ermutigung. An Tanja Diem und Barbara Lafferton für die kompetente Einführung in die Laborarbeit und die Lösung vieler kleiner Laborprobleme. An Jasmin Korbmacher für Ihre Unterstützung beim Klonieren der Ferrireduktasen und viele gelungene Blots. An Aklil Abera, Anne-Therese Henze, Marta Garzon, Dr. med. Daniel Sommerlad und Sascha Seidel für ihre Unterstützung in der Endphase und das Korrektur lesen meiner Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich auch allen anderen Kolleginnen und Kollegen im Edinger Institut für die nette Zusammenarbeit danken. Eure Hilfe und Unterstützung hat einen großen Teil zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen!

Besondere Verdienste hat sich auch Dr. Karina Schierling erworben, die einen Korrekturlese-Spurt hingelegt hat und danach viele Vorschläge hatte, die zum Teil in diesen Seiten zu finden sind!

Außerdem möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich in den letzten Jahren begleitet und in nicht-biologischer Hinsicht unterstützt haben: Ingeborg Landgraf, Familie Thun, Familie Wenner und insbesondere bei meinem Mann Birger, ohne den ich nie hier angekommen wäre.

Danke!



Julia Wenner, geb. Landgraf
Rothschildallee 35
60389 Frankfurt

Telefon (privat) 069-43053971
 Email juliawenner@gmx.net

Geburtsdag 6. Januar 1975
 Geburtsort Karlsruhe
 Familienstand verheiratet

Ausbildung

6/1995	Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Neureut, Karlsruhe mit den Leistungskursen Englisch und Biologie (Gesamtnote: 1,3)
10/1995 – 8/2001	Studium der Biologie an der Universität Ulm und der University of Guelph, Kanada
10/1997	Vordiplom an der Universität Ulm (Gesamtnote: sehr gut)
5/2000 - 9/2000	Diplomprüfungen an der Universität Ulm im Hauptfach Zoologie (Note 1,0) und den Nebenfächern Biochemie (Note 1,0), Genetik (Note 1,0) und Analytische Chemie (Note 1,3)
10/2000 - 8/2001	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Speit; Abt. Humangenetik, Universität Ulm „Charakterisierung der Mutagensensitivität lymphoblastoider Zelllinien mit einer Mutation im <i>BRCA1</i> -Gen“ (Note 1,0)
8/2001	Abschluss als Diplom-Biologin an der Universität Ulm (Gesamtnote: sehr gut)
3/2003	Annahme als Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes im Rahmen des Promotionsprogramms
seit 3/2006	Weiterbildungsstudium Betriebswirtschaftslehre am Institut für Wirtschaftswissenschaftliche Weiterbildung der FernUniversität Hagen

beruflicher Werdegang

3/2002 - 9/2002	wissenschaftliche Angestellte in der Arbeitsgruppe von PD Dr. v. Briesen; Georg-Speyer-Haus; Frankfurt/M.
10/2002 – 3/2006	wissenschaftliche Angestellte / Promotionsstudentin bei Prof. Dr. Plate; Neurologisches Institut des Klinikums der J.W. Goethe Universität; Frankfurt/M.
seit 7/2005 bis heute	Koordination und zentrale Projektverwaltung des DFG-geförderten SFB/TR 23 „Vascular differentiation and remodeling“